



Universidad Autónoma de Madrid
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina

INFLUENCIA DE LA VITAMINA D EN LA RESPUESTA DE LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS A LA TERAPIA FOTODINÁMICA

Tesis doctoral presentada por:
Ricardo Moreno Alonso de Celada
Madrid, año 2017

Directores:
Dra. Yolanda Gilaberte Calzada
Dr. Salvador González Rodríguez

Agradecimientos

El desarrollo de esta tesis doctoral me ha permitido comprender hasta qué punto la investigación científica requiere tanto la dedicación y fuerza de voluntad del doctorando, como el esfuerzo coordinado de un gran número de personas que con su trabajo y tiempo contribuyen desinteresadamente a que el proyecto investigador se desarrolle y alcance sus objetivos. Por ello quiero destacar y agradecer el papel que han tenido muchas de esas personas en la realización de esta tesis doctoral. Sin cada una de ellas, no me hubiera sido posible llegar hasta aquí.

Gracias a Yolanda Gilaberte, Ángeles Juarranz y Salvador González que me han guiado y alentado incansablemente en este trabajo, desde el primer contacto hasta los últimos desvelos, y que han creído en mí. Gracias por tanto tiempo y energía dedicados a este proyecto de investigación.

Gracias a mis compañeros dermatólogos del Hospital del Henares, Nuria Barrientos, María José Moreno de Vega, Patricia Abajo, y al jefe de unidad José D. Domínguez Auñón, por su apoyo diario a este largo trabajo. Y gracias, y mi orgullo, por el excelente trabajo de nuestras enfermeras Carmen Lara y Cristina Valero que tantas horas y ganas le han dedicado a este estudio, y auxiliares, Paloma Lozoya y Carmen Lara por estar pendientes de todo al detalle.

Quedo enormemente agradecido al Servicio Anatomía Patológica del Hospital del Henares dirigido por el Dr. Santiago Nieto, particularmente a los Dres. Ariel Díaz y Karen Villar. Y quiero aplaudir el excelente trabajo diario de todo el cuerpo técnico del servicio, destacando a Blanca Palomeque y Paco Merino por cuánto me han ayudado, siempre con una sonrisa.

Gracias a Silvia Lorrio, Joyce Díaz de Almeida y Marta Mascaraque del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma por su largo y eficaz trabajo con la inmunohistoquímica del estudio.

Muy especialmente, gracias a los Dras. Laura Nájera Botello y María Dolores Suárez Massa, patólogas del Hospital Puerta de Hierro, Dr. David de Lorenzo, de NIM Genetics, Dra. Sofía Pérez Calahorra, nutricionista, por sus contribuciones científicas, fundamentales en este trabajo.

Por último, gracias a mis padres, Ricardo y María, que me lo han dado todo a lo largo de mi vida y a quienes les debo lo que soy, a mis hermanos mayores, modelo e inspiración para superarme, y a mi mujer Rocío: mi felicidad, mi mayor apoyo, y la motivación para no rendirme ante ningún reto.

Resumen

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento de eficacia probada en varios tipos de cáncer cutáneo, entre ellos la queratosis actínica (QA), aunque con algunas limitaciones. Existe evidencia de que la aplicación tópica u oral de vitamina D (VD) mejora la respuesta del carcinoma escamoso a la TFD con metilaminolevulinato (MAL) en modelos animales.

El presente trabajo persigue caracterizar la influencia de la VD en la respuesta de las QA a la TFD con MAL, y explorar si otros factores bioquímicos, clínicos, histológicos y genéticos pueden jugar un papel predictivo en esta respuesta al tratamiento. Para ello se diseñó un estudio prospectivo piloto en 25 pacientes con QA en la cara y el cuero cabelludo, sometiéndolos a una sesión de TFD con MAL, para examinar la respuesta al tratamiento tras un periodo de observación de seis semanas. En la visita basal y en la de seguimiento se biopsió la QA de mayor grado clínico y se realizaron determinaciones séricas de VD y perfil lipídico, además de estudiar en muestras de sangre polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de los genes del receptor de la VD (VDR), de la proteína de unión a VD (VDBP), de la proteína 5 relacionada con el receptor LDL (LRP5), de la 25-hidroxilasa (CYP2R1) y de la región que codifica los genes de la dehidrocolesterol reductasa y NAD sintetasa (DHCR7/NADSYN).

Se observó una asociación estadísticamente significativa de la respuesta clínica de las QA a TFD con MAL con el nivel sérico basal de HDL, con la expresión basal de VDR y con los SNPs BsmI (rs1544410) y TaqI (rs731236) del gen del VDR. La respuesta histológica de las QA a TFD con MAL mostró asociación con los niveles séricos basales de VD y LDL, la expresión basal de aurora B kinasa y con el SNP rs11023380 del gen CYP2R1 de la 25-hidroxilasa. Además, en nuestra muestra de QA se apreció un descenso significativo de la expresión de p53, ki67, aurora B y survivina tras la TFD con MAL.

Estos hallazgos relacionados con los niveles séricos de VD y su receptor VDR sugieren que la VD influye en la respuesta de las queratosis actínicas a la TFD con MAL. Igualmente parece influir en la respuesta el perfil de colesterol y sus proteínas transportadoras. Nuestros resultados también señalan que el tratamiento de las QA con TFD con MAL tiene efectos sobre la proliferación, la apoptosis y la diferenciación queratinocíticas que podrían estar relacionados con su efectividad, algunos de los cuales no se han publicado anteriormente. Por último, sugiere que aurora B kinasa, cuya expresión en QA correlaciona positivamente con la respuesta al tratamiento, podría ser útil como un biomarcador predictor de la respuesta a TFD con MAL.

No obstante, son precisos estudios adecuados con muestras más amplias que corroboren los hallazgos observados en nuestra investigación.

Abstract

Photodynamic therapy is an effective treatment for different forms of skin cancer, among which are actinic keratoses (AK), in spite of some limitations. Evidence has shown that topical and oral administration of vitamin D (VD) enhances the response to MAL-PDT in animal models of squamous cell carcinoma.

The present research aims to characterize the influence of VD in the response of actinic keratoses to MAL-PDT, and to explore if other biochemical, clinical, histological and genetic factors could play a predictive role in this response. In order to answer these questions, we conducted a prospective pilot study on 25 individuals with AK in the face or the scalp, treating them with a single session of MAL-PDT, and assessing the response to treatment after a six week observation period. At baseline, and in the follow-up visit, the most severe AK was biopsied, and serum VD and lipids were determined. We also analyzed in blood samples twelve single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the VD receptor (VDR), VD binding protein (VDBP), LDL-related-protein-5 (LRP5), 25-hydroxylase (CYP2R1) genes and of the region that expresses dehydrocholesterol reductase and NAD synthase (DHCR7/NADSYN).

A significant association was observed of clinical response of AK to MAL-PDT and basal serum HDL levels, basal expression of VDR in sections of the index AK and SNPs BsmI (rs1544410) and TaqI (rs731236) of the VDR gene. Histological response showed a significant association with basal serum levels of VD and LDL, basal expression of aurora B kinase and with the SNP rs11023380 of the 25-hydroxylase gene, CYP2R1. Moreover, in our sample of patients with AK, a significant reduction in the expression of p53, ki67, aurora B kinase and survivin was observed after MAL-PDT.

These findings related with serum levels of VD and with its receptor suggest that VD may have an influence on the response of AK to MAL-PDT. The lipid profile, namely cholesterol and transporter lipoprotein serum levels, may also be related with the response to treatment. Our results show that the treatment of AK with MAL-PDT has specific effects on keratinocytic proliferation, apoptosis and differentiation that could be related with its effectiveness, some of which have not been published to the date. Finally, our data suggest that aurora B kinase, whose expression in AK correlates positively with the response to treatment, could be useful as a predictor biomarker of the response of AK to MAL-PDT.

However, further research in larger samples seems warranted to confirm the findings observed in our study.

Abreviaturas

ADN = ácido desoxirribonucleico

ARN = ácido ribonucleico

ARNlnc = cadenas largas de ARN no codificante

CBC = carcinoma basocelular

CCNM = cáncer cutáneo no melanoma

CEC = carcinoma espinocelular

CL= células de Langerhans

COX = ciclooxigenasa

CPDs = dímeros de pirimidina-ciclobutano

EGF = factor de crecimiento epidérmico, *epidermal growth factor*

EGFR = receptor del EGF

G-CSF. = factor estimulante de colonias de granulocitos

IL = interleucina

KIN= neoplasia intraepidérmica queratinocítica, *keratinocytic intraepidermal neoplasia*

MAL = metilaminolevulinato

PpIX = protoporfirina IX

PTH = hormona paratiroidea

QA = queratosis actínica(s)

ROS= especies reactivas de oxígeno

RUV= radiación ultravioleta

SNP= polimorfismo de nucleótido único, *single nucleotide polymorphism*

TFD= terapia fotodinámica

TNF = factor de necrosis tumoral

UVA/B/C= ultravioleta A/B/C

VD = vitamina D (1,25-OH₂-colecalciferol)

VDR = receptor de la VD

VDBP = proteína ligadora de VD

VIH= virus de la inmunodeficiencia humana

5-ALA/ALA = ácido 5-aminolevulínico

Tabla de contenido

A. Introducción	10
A.1. Queratosis actínicas	11
A.1.a. Clínica e histología	11
A.1.b. Epidemiología y factores de riesgo	13
A.1.c. Etiopatogenia y comportamiento biológico	16
A.1.d. Tratamientos para las queratosis actínicas	25
A.2. Terapia fotodinámica	29
A.2.a. Fotosensibilizantes y fuentes de luz	29
A.2.b. Mecanismos de destrucción tisular inducidos por la TFD	31
A.2.c. Eficacia y efectos adversos	33
A.3. Vitamina D	33
A.3.a. Metabolismo de la vitamina D	33
A.3.b. Receptor de la vitamina D	35
A.3.c. Fisiopatología de la vitamina D	36
A.3.d. Relación entre la vitamina D y el cáncer	37
A.3.e. Relación entre la vitamina D y la carcinogénesis cutánea	39
B. Justificación, hipótesis y objetivos	43
B.1. Justificación	44
B.2. Hipótesis	44
B.3. Objetivos	45
C. Pacientes y método	46
C.1. Diseño del estudio	47
C.2. Selección de pacientes	47
C.3. Procedimiento del tratamiento fotodinámico	48
C.4. Evaluación de respuesta clínica	48
C.5. Estudio histológico e inmunohistoquímico	49
C.6. Determinaciones séricas	51
C.7. Estudio de polimorfismos genéticos	51
C.8. Variables del estudio	53
C.9. Análisis estadístico	56
C.10. Tratamiento de la bibliografía	57
C.11. Aspectos éticos	57
D. Resultados	58
D.1. Características de la muestra	59
D.2. Hallazgos bioquímicos	63
D.3. Hallazgos histológicos	63
D.4. Hallazgos inmunohistoquímicos	65
D.5. Hallazgos genéticos	68
D.6. Asociación de las variables estudiadas con la respuesta al tratamiento	68
D.6.a Influencia de las variables clínicas	68
D.6.b Influencia de las variables bioquímicas	69
D.6.c Influencia de las variables histológicas e inmunohistoquímicas	70
D.6.d Influencia de los polimorfismos del gen del VDR y genes relacionados	71
D.7. Análisis multivariante	72
E. Discusión	74
E.1. Efectividad de la TFD y cambios producidos por el tratamiento	76
E.2. Niveles séricos de vitamina D	76
E.3. VDR	78
E.4. Polimorfismos del VDR y genes relacionados	79
E.5. Lípidos séricos	80
E.6. Ki67 y p53	82

E.7. Survivina y Aurora B.....	82
E.8. Limitaciones del estudio	84
F. Conclusiones	85
G. Financiación	87
H. Bibliografía	89
H. Anexos	100
H.1. Anexo 1: Carta de aprobación del C.E.I.C.	101
H.2. Anexo 2: Documento de consentimiento informado del estudio.....	102
H.3. Anexo 1: Documento de consentimiento informado para terapia fotodinámica.....	105

A.1. Queratosis actínicas

A.1.a. Clínica e histología

La queratosis actínica (QA) se define clínicamente como un área de displasia queratinocítica inducida en la epidermis por la exposición solar crónica en personas de piel clara(1). Se manifiesta como un área cutánea eritematosa o rosada, de 0,5 a 3cm, con cambios epidérmicos que varían entre el tacto “de papel de lija” hasta la hiperqueratosis franca en forma de “costra” o de “cuerno cutáneo”. Aparece, junto con otros cambios cutáneos típicos (léntigos, atrofia epidérmica, comedones), en zonas de daño solar avanzado como la cara, el cuero cabelludo, el cuello, las manos, y con menor frecuencia en los brazos, la parte superior del tronco y las piernas (fig. 1).

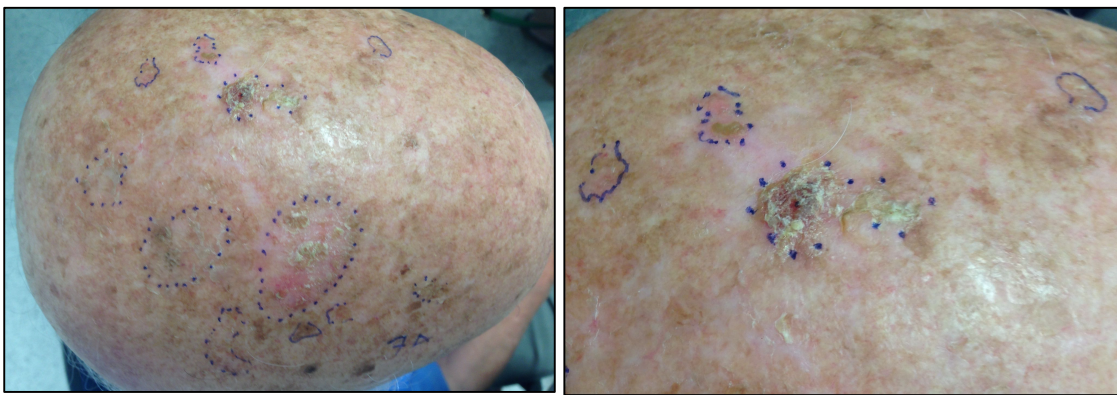


Fig. 1 Queratosis actínicas de distinto grado clínico en el cuero cabelludo de un anciano con intenso daño solar crónico

Su historia natural incluye una progresión lenta, a lo largo de varios años. Inicialmente pueden presentarse como lesiones pequeñas, planas, discretas, con eritema e hiperqueratosis mínimos, para agravarse con el tiempo aumentando en diámetro e hiperqueratosis, paralelamente a la gravedad de la displasia queratinocítica que presentan a nivel histológico. En este contexto, se ha estimado que entre el 18 y el 63% de QA, según distintos estudios(2), regresan en vez de progresar.

Clínicamente, las QA pueden ser dolorosas o hipersensibles al roce, además de producir un efecto inestético dadas sus localizaciones en zonas expuestas. Olsen et al. definieron en 1991 una clasificación clínica de la gravedad de las QA: grado 1 o leve para lesiones visibles, no palpables, grado 2 o moderada para QA claramente palpables y grado 3 o grave para lesiones hiperqueratósicas, ulceradas y dolorosas (3).

Se debate si se trata de una lesión precursora de carcinoma espinocelular, o si debe considerarse como una neoplasia in situ (un carcinoma epidermoide intraepidérmico) desde su aparición(4). Se ha estimado el riesgo anual de progresión de una QA a CEC en 0,53-0,75%(5)(6).

A nivel histológico, las QA muestran queratinocitos atípicos de mayor tamaño que los normales, con pérdida de polaridad y confinados a las capas basales de la epidermis. Además, la epidermis de una QA varía en conjunto desde la atrofia a la hiperplasia; hay pérdida de las crestas epidérmicas y paraqueratosis en las áreas donde se agrupan los queratinocitos atípicos (fig.2). En general, los límites de la lesión se pueden distinguir bien de la epidermis sana adyacente. En la dermis se suele observar elastosis solar y de forma variable un infiltrado linfocitario(7).

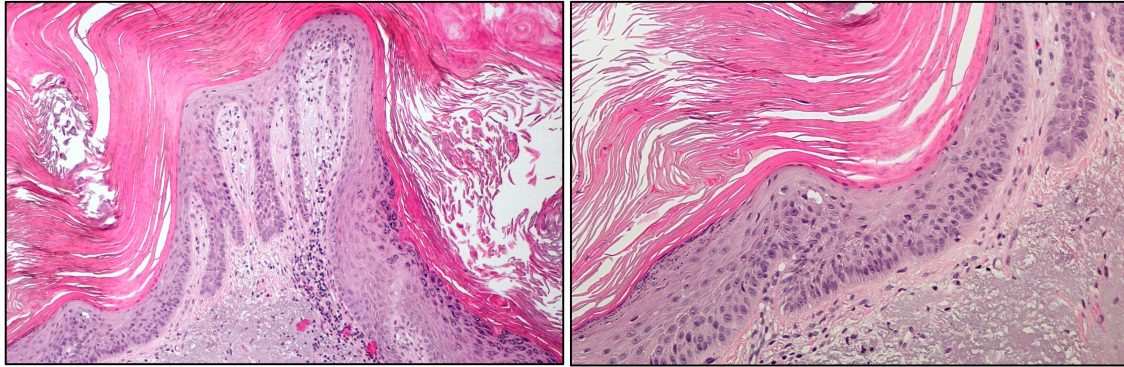


Fig. 2 Queratosis actínica (10x y 20x): presencia de queratinocitos atípicos en estratos bajos de la epidermis con pérdida de crestas y paraqueratosis

Se han descrito algunas variantes de la QA clásica atendiendo a peculiaridades clínicas e histológicas(7):

- **Queratosis actínica hipertrófica:** caracterizada por la presencia de una epidermis papilomatosa con un grueso estrato córneo y áreas de paraqueratosis (fig.3).
- **Queratosis actínica acantolítica:** en ella, se produce pérdida de cohesión entre queratinocitos, visualizándose grupos de “disqueratinocitos” flotando en hendiduras intraepidérmicas.
- **Queratosis actínica atrófica:** representa el cambio opuesto a la QA hipertrófica: un adelgazamiento general del grosor de la epidermis con disminución o pérdida de las crestas interpapilares.
- **Queratosis actínica bowenoide:** se presenta con atipia queratinocítica en todo el espesor de la epidermis, y aunque en ocasiones es indistinguible de la verdadera enfermedad de Bowen o carcinoma espinocelular in situ, se diferencia en que en la QA bowenoide no está afecto el epitelio anexial. Se ha descrito la utilidad de inmunomarcadores como la citoqueratina 10(8) o el lumican(9) para diferenciar ambas entidades (fig. 3)

- **Queratosis actínica liquenoide:** presenta un denso infiltrado linfocitario en banda en la dermis subyacente a la lesión epidérmica (fig. 3)

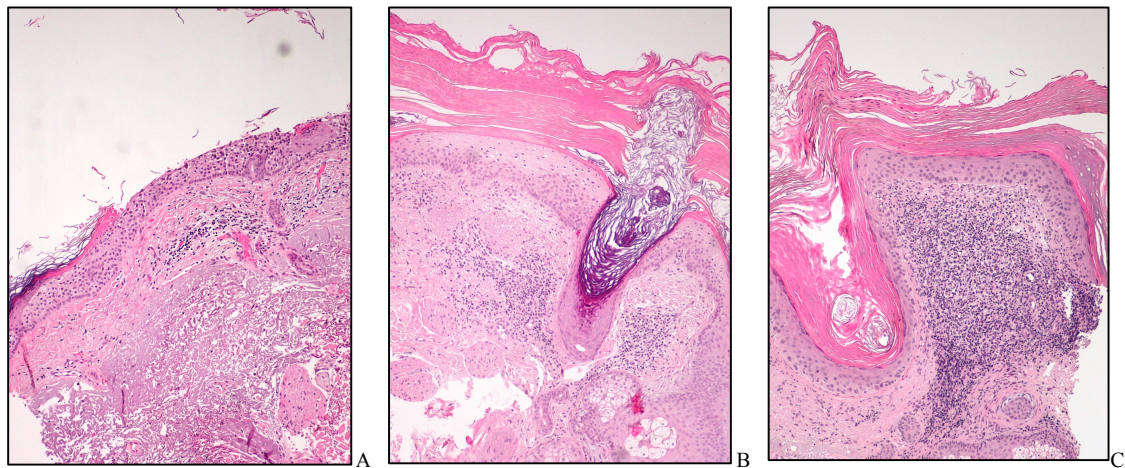


Fig. 3 Variedades histológicas de QA índice en tres pacientes: bowenoide (A), hipertrófica(B) y liquenoide(C)

Se sabe poco acerca de las implicaciones clínicas asociadas a la variedad de formas histológicas de QA, aunque se ha sugerido que las QA bowenoides tienen un mayor potencial maligno que las atróficas y las acantolíticas(10). En cuanto a sus características clínicas, se presume que aquellas lesiones dolorosas o ulceradas progresan con mayor frecuencia a CEC(2); así como si en el paciente coexiste algún factor facilitador como la inmunosupresión(11).

A.1.b. Epidemiología y factores de riesgo

Las QA se considera una patología propia de personas de fototipo cutáneo claro. Su frecuencia las sitúa en los primeros puestos en los estudios de motivos de consulta comunes. Así, fueron, tras el acné, el motivo de consulta dermatológico más frecuente en los Estados Unidos de 2001 a 2010, suponiendo un 11,4% de las consultas por condiciones dermatológicas a dermatólogos y no dermatólogos(12).

Algunos estudios poblacionales sobre prevalencia de QA concluyen que son más frecuentes en ancianos de ascendencia caucásica, sometidos a una importante carga de radiación ultravioleta acumulada. Sin embargo, la prevalencia reportada en estos trabajos difiere mucho. En un estudio poblacional sobre 2061 pacientes de edad igual o mayor a 45 años en Holanda, se hallaron QA en un 49% de los hombres (I.C. 95% 46-52%) y un 28% de las mujeres (26-31%)(13); sin embargo, en otro estudio realizado en Italia se ha estimado la prevalencia general de QA en pacientes de 45 años o mayores en un 1,4% (I.C. 95% 1,2-1,8%)(14). En Austria(15), una investigación en pacientes mayores de 30 años refleja una prevalencia total del 31%, de nuevo mayor en hombres (39,2%) que en mujeres (24,3%). La mayor prevalencia en hombres

que en mujeres se explica tradicionalmente por su mayor presencia al aire libre en el ámbito laboral.

En España, el estudio EPIQA(16) realizado sobre 3877 pacientes en consultas hospitalarias de dermatología a nivel nacional revela que las QA afectan a un 23,5% de la población mayor de 45 años, con una edad media de presentación a los 73,3 años, y confirma su mayor frecuencia en hombres (59,5% de los diagnósticos) que en mujeres (40,5%).

Diversos factores de riesgo han demostrado contribuir al desarrollo de queratosis actínicas(17) (18):

A.1.b.1. Susceptibilidad asociada al fenotipo

Se han establecido varios factores de riesgo en el desarrollo de queratosis actínicas en pacientes europeos: el **fototipo claro** aumenta el riesgo, de tal modo que los individuos con fototipo IV según la clasificación de Fitzpatrick presentan 9 veces menos queratosis actínicas que los de fototipo I. Igualmente son factores de riesgo los rasgos fenotípicos asociados al fototipo I (**cabello pelirrojo** frente a negro, **ojos claros** frente a marrones) o el **número de nevos melanocíticos** en relación directamente proporcional, frente a la ausencia de ellos.

A.1.b.2. Susceptibilidad relacionada con el modo de vida

El principal factor de riesgo para el desarrollo de QA es la historia de exposición solar significativa, tanto aguda intermitente (quemaduras solares) como la exposición solar acumulada a lo largo de la vida. Se ha encontrado(18) riesgo significativamente mayor para las **quemaduras solares en la infancia**, el **número de léntigos solares en cara o brazos** –signo directo de exposición solar acumulada y que se relaciona de forma directamente proporcional- o los **antecedentes de trabajo al aire libre**, **aficiones al aire libre** o **residencia en un país tropical** (18). Cualquier **nivel educacional** muestra ser significativamente protector del desarrollo de QA frente a la falta de estudios. En cuanto a la residencia en zonas de mayor exposición solar, no sólo la latitud sino también la **altitud** afecta a la intensidad de radiación UVB recibida, de modo que se calcula que la incidencia de QA aumenta un 8-10% por cada incremento de 300m de altura(19).

A.1.b.3. Medicación

La historia de tratamiento con **diuréticos tiazídicos** o **medicamentos cardiológicos fotosensibilizantes** (como los antiarrítmicos amiodarona y diltiazem) aumentan significativamente el riesgo de desarrollar QA (18). Los **inhibidores de RAF** como vemurafenib y sorafenib parecen implicados tanto en el desarrollo de QA como en la progresión

a CEC y queratoacantoma a partir de QA(20). También la **hidroxiurea** empleada en algunas formas de anemia y síndrome mielodisplásico se ha descrito asociada al desarrollo de un mayor número de QA y de CEC agresivo(21). Por el contrario, medicamentos como los **inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina** y los **antagonistas del receptor de angiotensina II** se han demostrado protectores frente al desarrollo de CEC en un metaanálisis reciente(22).

A.1.b.4. Inmunosupresión

La inmunosupresión de varios tipos produce un claro aumento en el riesgo de desarrollar QA. En pacientes transplantados(23), la terapia inmunosupresora predispone a la aparición de QA y la progresión a carcinoma espinocelular de tal modo que se invierte la tendencia de la población general, al ser en estos pacientes más incidente el CEC que el carcinoma basocelular (CBC). Esta tendencia es mayor en función de las dosis, el número y la duración de los tratamientos inmunosupresores(24).

A.1.b.5. Trastornos genéticos con fotosensibilidad

Una variedad de **síndromes genéticos** predisponen al individuo a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de piel(7), incluyendo mayor frecuencia de QA como lesiones precursoras:

- El **xeroderma pigmentoso** es un trastorno genético de transmisión autosómica recesiva, caracterizado por mutaciones en 8 genes relacionados con la reparación por escisión de nucleótidos del ADN que provocan una sensibilidad extrema a los efectos perniciosos de la radiación ultravioleta. Se ha estimado que aumenta en unas 5.000 veces el riesgo de padecer cáncer de piel antes de los 20 años, tanto melanoma como del tipo “no-melanoma” (cáncer cutáneo no melanoma CCNM). En varios tipos de XP se pueden presentar QA desde la primera infancia. Estos individuos están obligados a evitar de forma estricta la exposición no protegida a la luz solar.
- El **albinismo oculocutáneo** se caracteriza por un grado variable de pérdida de pigmento en la piel, el pelo y los ojos, y tiene su origen en varios defectos genéticos que se transmiten de forma autosómica recesiva; al igual que en el XP predispone al desarrollo de melanoma y CCNM a edades tempranas.
- Otros como los **síndromes de Bloom o Rothmund-Thompson** asocian fotosensibilidad cutánea y poiquilodermia, con riesgo de CPNM precoz. En el caso del **síndrome de Cockayne** pueden presentar envejecimiento prematuro junto con la fotosensibilidad y el riesgo de carcinoma queratinocítico.

A.1.c. Etiopatogenia y comportamiento biológico

En términos generales, toda neoplasia comienza con una serie de mutaciones genéticas y epigenéticas que, de forma secuencial, transforman las células sanas haciendo que escapen al control del ciclo celular. Así, en teoría se genera una célula maligna (clonicidad del cáncer) que se multiplica para generar un tejido con capacidad ilimitada de crecimiento y eventualmente de invasión de otros tejidos.

Las formas de cáncer más frecuentes son las derivadas de tejido epitelial (carcinomas), como ocurre en los cánceres de piel, mama, pulmón, próstata o colon. Las células tumorales presentan seis características, definidas en 2000 por Hanahan y Weinberg, de las que derivan su agresividad y capacidad de crecimiento: autosuficiencia respecto de las señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitoras de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis conservada y capacidad de invasión tisular y metastatización(25). Para alcanzar estas capacidades, la célula tumoral sufre mutaciones que inactivan genes supresores tumorales como p53 y activan oncogenes responsables de proliferación incontrolada. Se ha definido un modelo de carcinogénesis en tres etapas secuenciales que, de forma acumulativa, producen en las células tumorales estos cambios (fig.4):

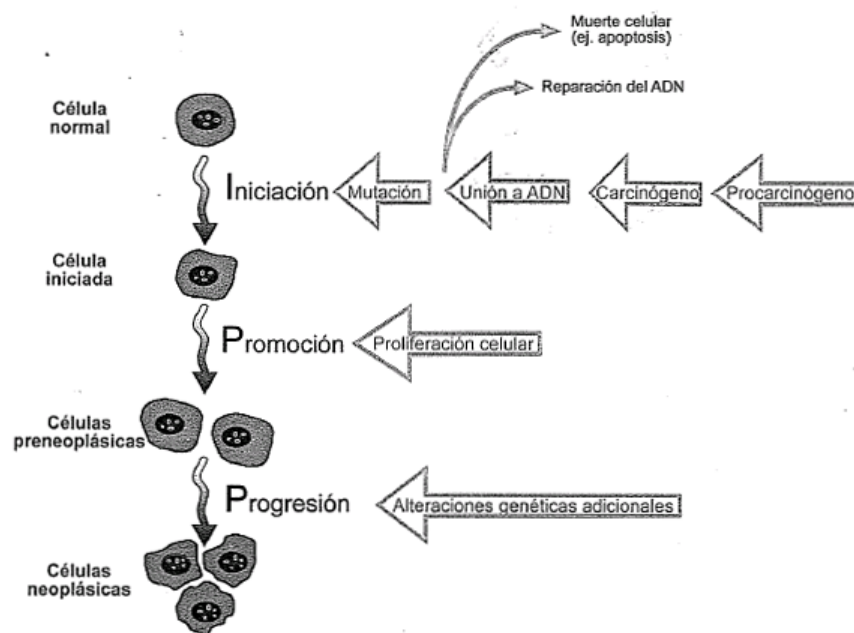


Fig. 4 Etapas de la carcinogénesis (Hanahan y Weinberg, Cell 2000)

En la **iniciación**, factores mutagénicos provocan cambios en el ADN que no son reparados, y que son responsables de fallos en los mecanismos de control del ciclo celular y la señalización intercelular. Al ser insensibles a la señalización para entrar en apoptosis, estas células con

cambios genéticos precancerígenos persisten y son capaces de dividirse, transmitiendo a su descendencia celular estas alteraciones. En este punto se considera empezado el proceso de carcinogénesis.

En la fase llamada de **promoción** se produce una expansión clonal de las células iniciadas, conformando una masa celular precancerígena que no puede desarrollarse sin ser mantenida por estímulos promotores. Un sistema inmune en correcto funcionamiento es, en este punto, responsable de la detección de células transformadas y generación de una respuesta citotóxica frente a ellas; si esto no ocurre, continúa el proceso de carcinogénesis.

Un tercer estadio o de **progresión** supone la fase definitiva en el desarrollo del cáncer. Nuevas señales mutagénicas generan más cambios en el ADN que facultan a las células preneoplásicas para continuar multiplicándose, invadir otros tejidos y mantener una angiogénesis que garantice la nutrición de la masa tumoral en crecimiento, expansión y diseminación.

La QA como lesión preneoplásica, o carcinoma espinocelular in situ, representa un estadio intermedio en el proceso de carcinogénesis, y por ello reúne en sí la triple capacidad de permanecer, regresar, o progresar a carcinoma invasor. Se han descrito varios estímulos mutagénicos capaces de provocar la aparición de QA, de los cuales, el más importante es la radiación ultravioleta.

Yantsos y cols.(26) pretendieron ilustrar la progresión de la QA a CEC estableciendo una analogía con las lesiones precursoras de otras neoplasias epiteliales como el cáncer de cérvix. Propusieron para las QA una clasificación en función de la fracción de epidermis ocupada por la atipia citológica de la QA. Según esto, proponían el término KIN (*keratinocyte intraepidermal neoplasia*) y los grados I (atipia en el tercio inferior de la epidermis), II (dos tercios inferiores) y III (atipia en la totalidad del grosor de la epidermis). Røwert-Huber y cols. en 2007(4) renombraron los grados como *early in situ SCC type AK I*, *early in situ SCC type AK II*, *in situ SCC type AK III*.

Esta clasificación fue criticada por varios motivos, entre ellos que implica una progresión ordenada de KIN I a KIN III hasta la transformación en CEC, paralelamente a lo que ocurre en el carcinoma de cuello de útero. Sin embargo, esto no es aplicable al CEC. En este sentido, Fernández-Figueras y cols. (27) han contradicho esta idea en un estudio sobre 196 biopsias de CEC invasivo, que reveló que la lesión preneoplásica más frecuentemente asociada al CEC invasivo es la QA de grado KIN I (hallada en la epidermis adyacente al tumor en 77,9% de las biopsias, frente a 6,6% de KIN II y 8,3% e KIN III). Proponen, por tanto, como alternativa a la “vía clásica” de progresión escalonada de la QA al CEC, una “vía diferenciada” en la que el

CEC se desarrolla directamente a partir de lesiones KIN I de bajo grado clínico-histológico (fig.5).

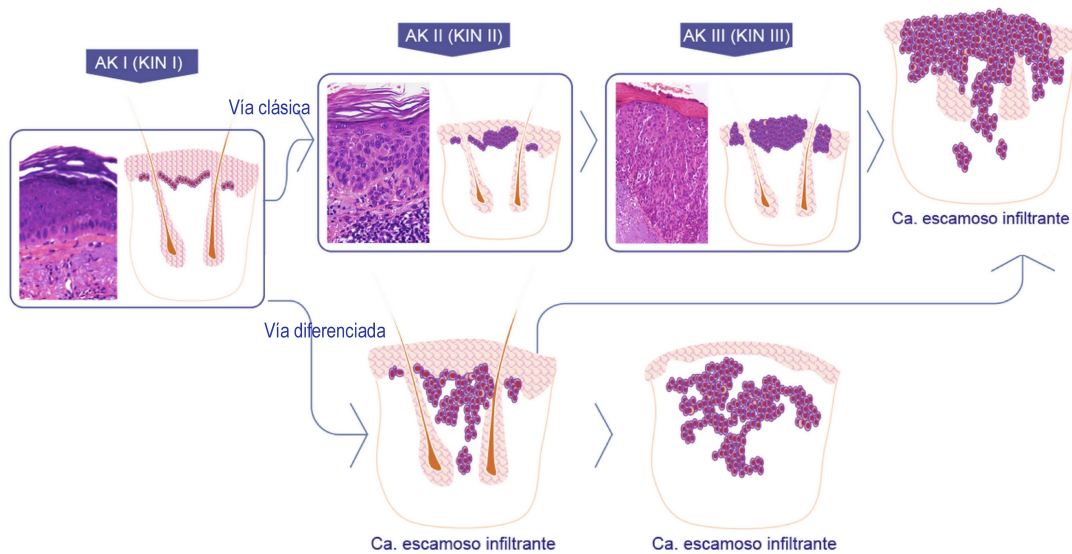


Fig. 5 Transformación de QA grado KIN I a carcinoma escamoso según la asunción tradicional de una progresión escalonada de la displasia hasta la lesión infiltrante (vía clásica), y según la alternativa “vía diferenciada” propuesta por Fdz.-Figueras y cols(28)

Se han descrito la implicación de los siguientes factores etiopatogénicos en la carcinogénesis epidérmica:

A.1.c.1 Radiación ultravioleta

Diferentes tipos de cáncer de piel, incluso diferentes tipos de carcinomas queratinocíticos, se relacionan con la exposición solar en general. Sin embargo, mientras que el carcinoma de queratinocitos basales se asocia a la exposición solar intermitente y la exposición solar excesiva (quemaduras), la QA y el carcinoma espinocelular parecen estar relacionados con la exposición solar acumulada y la sensibilidad constitucional o fenotípica (sobre todo el fototipo claro como se ha detallado en el apartado de factores de riesgo). También la exposición solar reciente influye en el desarrollo de nuevas QA, y por el contrario su evasión favorece la regresión de QA(29).

El espectro de radiación ultravioleta (RUV) solar comprende las longitudes de onda entre 100 y 400nm, por encima de las cuales se encuentra la luz visible. La RUV C es aquella de menor longitud de onda (100-280nm) y tiene una alta capacidad mutagénica; sin embargo, queda retenida por la capa de ozono, por lo que su papel en el cáncer humano es despreciable (Fig. 6).

La RUV B (280 a 315nm) también puede ser retenida por la capa de ozono, pero un porcentaje significativo de ella alcanza la superficie terrestre (un 5% de la RUV total que recibimos). Tiene

la capacidad de penetrar hasta la capa basal de la epidermis, y por ello es la responsable del bronceado y del eritema solar o “quemadura”. Es absorbida directamente por el ADN de los queratinocitos, generando en ellos dos cambios muy específicos: los dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs) y los fotoproductos de 6-4-pirimidina-pirimidona (6-4 PPs) a partir de cualquier punto del ADN con dos bases de pirimidina adyacentes de la misma cadena. Por su especificidad, estos cambios reciben el nombre de “mutaciones firma” de la RUV B. Los queratinocitos dañados por la RUV-B suelen llamarse “*sunburn cells*”(30) o células disqueratósicas.



Fig. 6 Espectro solar, efectos biológicos y penetración en la piel

La RUV A (315-400nm) supone el 95% de la RUV que alcanza la superficie terrestre, y penetra en la piel humana hasta la dermis, generando en ella cambios arquitecturales (elastosis solar) propios del fotoenvejecimiento, de la inmunosupresión local y de la formación de radicales libres de oxígeno. Por tanto, aunque es mínimamente absorbida directamente por el ADN, su principal contribución a la carcinogénesis es de forma indirecta mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno que dan lugar a la formación de 8-OH-guanosina.

A.1.c.2. Virus del Papiloma Humano

Es bien conocida la relación del carcinoma epidermoide genitoanal con la infección previa por genotipos como 16 ó 18 de VPH, predisponentes a riesgo de displasia epitelial. La acción del VPH a este nivel puede abolir el control de la proteína p53 provocando la inmortalización de los queratinocitos humanos en los carcinomas de cuello de útero, ano, vagina, vulva, etc.

Igualmente se ha detectado la presencia de VPH en carcinomas queratinocíticos de otras localizaciones. Se ha visto que la infección por VPH es más prevalente en piel crónicamente expuesta a UV que en piel no fotoexpuesta. Algunos autores han sugerido que la inmunosupresión originada por la fotoexposición crónica, induciría una mayor susceptibilidad para el contagio por VPH, que a su vez actuaría como un cofactor en el proceso de carcinogénesis(31).

Se han hallado algunos genotipos concretos de VPH del género betapapiloma (107, 110, 111 y FA75) que están presentes con mayor frecuencia en las QA que en la piel sana(32), y en carcinomas epidérmicos, aunque se debate si juegan un papel causal(33) o casual.

A.1.c.3. Otros factores

- *Radiaciones ionizantes*: Diferentes formas de radiación ionizante se han demostrado asociadas al desarrollo sobre todo de CBC. En el riesgo de desarrollo de CBC asociado a radioterapia está implicada la edad a la que se recibió el tratamiento(34).

- *Inflamación cutánea crónica*: Las cicatrices de quemaduras graves, la piel que recubre el área donde se produjo una osteomielitis(35) y la piel dañada por ciertas enfermedades inflamatorias cutáneas crónicas como el liquen escleroatrófico(36) tienen más probabilidades de padecer CEC. En la zona vulvar, el riesgo de padecer un CEC derivado de esta enfermedad aumenta llamativamente del 1,2% a los 24 meses del inicio, al 36,8% tras 300 meses(37).

- *Agentes tóxicos*: la exposición crónica a arsénico como contaminante del agua potable predispone a varias neoplasias (pulmón, vejiga y riñón, hígado) y favorece el desarrollo de CCNM. En carcinogénesis cutánea se ha relacionado el desarrollo de CBC y CEC con una disfunción en p53 producida por el arsénico(38).

A.1.c.4. Mecanismos patogénicos de las queratosis actínicas

Slaughter y colaboradores en 1953 esbozaron el concepto de **campo de cancerización** como el área peritumoral que presenta alteraciones premalignas, que puede influir en la multifocalidad de las neoplasias epiteliales y justificar fenómenos como el de la recurrencia tumoral o el segundo tumor en la misma localización(39) (fig. 7).

En la última década se ha retomado este concepto de campo de cancerización en el terreno de los carcinomas queratinocíticos inducidos por la RUV, y se han definido algunas de sus características histológicas, moleculares y genéticas. Su enorme interés radica en que su estudio permite conocer la patogenia de las QA.

En 2003 se describió el campo de cancerización como el área peritumoral de células epiteliales con cambios preneoplásicos: alteraciones histológicas de displasia, mayor índice de proliferación y ausencia de un patrón infiltrativo o metastásico, que serían definitorios de una verdadera neoplasia; cambios que corresponderían a QA subclínicas. Se estima que la presencia

de QA subclínicas en estas áreas es diez veces superior a la de QA visibles(40). El fenómeno de campo de cancerización se explica como un modelo de expansión clonal en la continuidad de la epidermis, que se basa en que las células alteradas por un mismo carcinógeno pueden coalescer(41). Posteriormente se ha descrito que la RUV también producen mutaciones en el ADN de los fibroblastos del campo de cancerización, que determinan cambios inflamatorios y atróficos en el estroma que predisponen al CCNM(42).

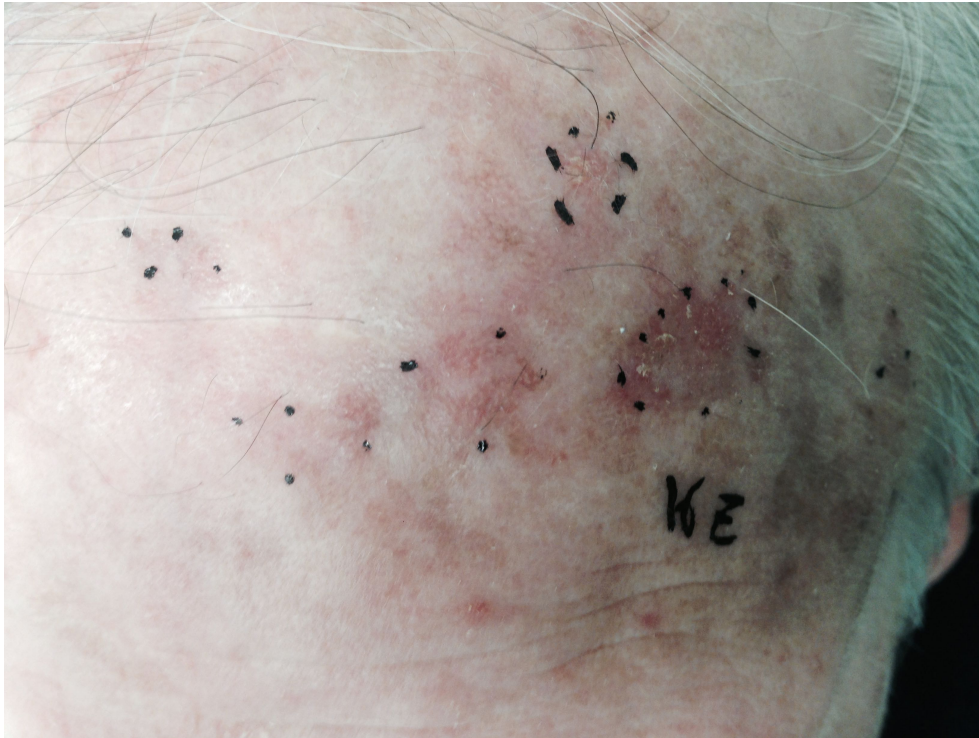


Fig. 7 La presencia de múltiples queratosis actínicas es considerado el principal marcador del proceso de campo de cancerización cutáneo de origen solar. El área circundante a las lesiones tumorales presenta cambios moleculares preneoplásicos similares a los de las lesiones clínicamente evidentes (43).

Los siguientes cambios genéticos y moleculares han sido descritos en las queratosis actínicas:

- Efectos directos de la RUV sobre el ADN

Uno de los eventos más precoces en el proceso de carcinogénesis cutánea inducida por la RUV es la aparición de **mutaciones inactivadoras en el gen supresor tumoral p53**. La proteína supresora tumoral p53 se activa en los queratinocitos ante el daño sobre el ADN, y es central en la respuesta antes este daño (fig. 8).

P53 regula la transcripción de una variedad de genes implicados en crecimiento celular, reparación del ADN, y activación de diferentes cascadas pro- y anti apoptóticas. El normal funcionamiento de p53 hace por tanto que los queratinocitos con daño en el ADN detengan su ciclo celular para permitir la reparación de las mutaciones o entren en apoptosis. Sin embargo,

en el cáncer cutáneo inducido por el sol, p53 presenta “mutaciones firma” propias de la RUV-B que inactivan su función, permitiendo que las células mutadas escapen a los mecanismos de reparación o muerte programada. Se ha hallado p53 mutado por la RUV-B en piel sana fotoexpuesta(44), en el 50% de las QA y hasta el 90% de los CCNM estudiados(45).



Fig. 8 Intensa expresión nuclear de p53 en una QA grado KIN III

Las proteínas **aurora kinasa B** y **survivina**, junto a borealina y el denominado INCENP (inner centromer protein) componen el *chromosome passenger complex*, responsable de la correcta segregación de cromosomas desde el centrómero durante la mitosis, jugando por tanto un papel pivotal en el cáncer en general. Aurora kinasa B se ha hallado sobreexpresada en varios cánceres humanos, y se ha reportado que su sobreexpresión fosforila y degrada p53(46).

El significado de la expresión de estas proteínas en QA no ha sido estudiado hasta ahora (fig.9). Se ha descrito que la positividad nuclear para survivina es mayor en las queratosis actínicas que en la epidermis sana, y máxima en el CEC; además, en los CEC invasores, survivina se localiza principalmente en áreas profundas del componente infiltrante, asociándose por tanto a una migración celular incrementada(47). Survivina es capaz de frenar la apoptosis inducida por el daño UV, oponiéndose a la eliminación de células cancerígenas por p53(48)(49). Hasta el momento no se conoce si existe una influencia directa o indirecta de la RUV sobre survivina o aurora b kinasa.

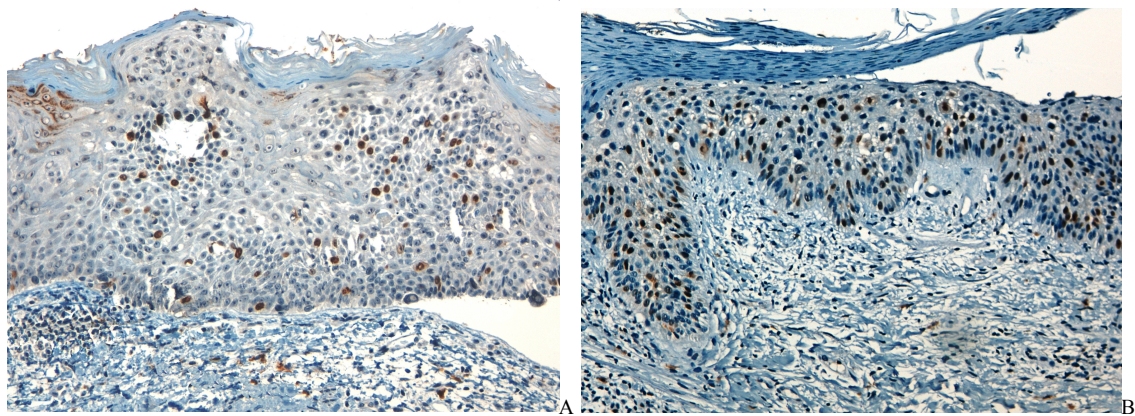


Fig. 9 Positividad celular para inmunotinción con aurora B kinasa (A) y survivina (B) en dos QA

La proteína **ciclina D1** es otra molécula frecuentemente alterada en varias vías de carcinogénesis. Es una proteína implicada en el ciclo celular, de tal modo que su inhibición selectiva induce apoptosis. En el ciclo celular normal, ciclina D1 es inhibida por p53. Sin embargo se ha encontrado sobreexpresada en varios tumores incluido el CEC, en el que tiene gran importancia al tener valor pronóstico y ser marcador de agresividad(50). En QA se ha hallado sobreexpresión de ciclina D1 en aproximadamente la mitad de casos(51).

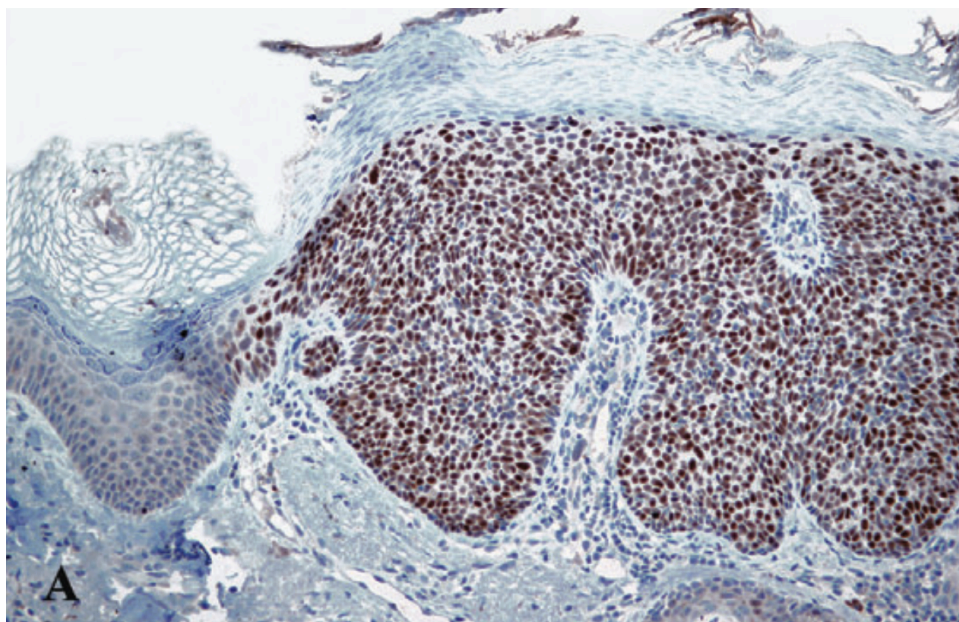


Fig. 10 Positividad celular para ciclina D1 en una muestra de CEC (Brasanac 2016 (52)).

- *Efectos de la RUV sobre la señalización intracelular*

Del mismo modo que la RUV puede generar cambios en el ADN de forma directa, también lo hace influyendo en la expresión génica mediante la inducción de factores de transcripción y receptores de citocinas. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**) se activa en los queratinocitos en respuesta a la luz UV a través de la inhibición oxidativa (por las ERO generadas por la RUV) de la proteína tirosina fosfatasa, que regula negativamente el EGFR manteniéndolo sin fosforilar y por tanto inactivo(53). EGFR activado media en varias vías de señalización relacionadas con la proliferación queratinocítica. Se ha demostrado que hay una expresión alterada de EGFR en el 52% de queratosis actínicas y el 77% de los CEC(54). EGFR ya se utiliza como diana terapéutica en varios carcinomas epidermoides (inhibidores del EGFR como cetuximab).

La RUV también puede alterar la señalización intracelular por mecanismos multifactoriales en otras proteínas transductoras de señales como las **MAP kinasas**, **JNK**, **ERK1 y 2**, o factores de transcripción como **NF-κB**(55).

- Cambios en la membrana basal y la matriz extracelular

La interacción de los queratinocitos tumorales en una neoplasia in situ como la QA con la lámina basal y la matriz extracelular permite la invasión de estructuras adyacentes y en último término la metastatización. Así, se ha descrito la importancia en este proceso de proteínas de la lámina basal y la matriz extracelular como **laminina 332**(56), algunas **metaloproteinasas** o la **β-catenina**(57).

- Efectos sobre la vía de señalización de COX

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima que permite al organismo sintetizar prostaglandinas a partir del ácido araquidónico de la membrana extracelular. Esta enzima se halla en la mayoría de los tipos celulares. Presenta dos isoformas, la COX-1, implicada en multitud de funciones fisiológicas, y la COX-2, cuya expresión es inducida por citoquinas y factores de transcripción, estando por tanto claramente relacionada con situaciones no fisiológicas como la inflamación o el cáncer. La COX-2 y su producto, la PGE-2, han demostrado estimular el crecimiento tumoral de forma directa activando las vías RAS/Raf/MAP y PI3k/Akt, e indirecta mediante la inducción de la expresión del receptor del EFG; además estimulan la neoangiogénesis e inhiben la apoptosis. La RUV-B tiene la capacidad de inducir la expresión de **COX-2**, y datos como que esta isoforma de la enzima esté sobreexpresada en CCNM y que los inhibidores de la COX-2 como celecoxib influyen en el menor desarrollo de tumores cutáneos inducidos por UVB en

estudios animales confirman que esta enzima tiene una gran importancia en la carcinogénesis epitelial(58).

- Fotoinmunosupresión

La RUV suprime las respuestas inmunes cutáneas que normalmente detectarían y evitarían progresión de neoplasias cutáneas. Se han observado diferentes formas de daño solar al sistema inmune cutáneo, representado por las **células de Langerhans (CL) epidérmicas**: la RUV induce la liberación de citoquinas proinflamatorias que inhiben la presentación de antígenos por parte de las CL(59); la acumulación de ácido cis-urocánico, la forma isomerizada por RUV del ácido trans-urocánico de la superficie cutánea, también inhibe la presentación de antígenos de las CL(60). El ambiente oxidativo producido por la RUV también depleciona la epidermis de CL(61); además, la peroxidación lipídica debida al estrés oxidativo está implicada en la producción y liberación de prostaglandinas y citoquinas que influyen en las respuestas inmunes a distancia.

A.1.d. Tratamientos para las queratosis actínicas

Las QA representan el daño que la radiación solar acumulada a lo largo de la vida ha generado en la epidermis. Tanto por su carácter sintomático como por su condición de lesiones preneoplásicas o neoplasias “in situ”, se admite que deben ser tratadas cuando se diagnostican. La tendencia tradicional a tratar las lesiones de forma aislada ha evolucionado progresivamente a tener como objetivo el tratamiento integral del campo de cancerización. En este sentido, tratamientos como la terapia fotodinámica, el imiquimod o el ingenol mebutato superan a otros dirigidos frente a la lesión en particular como la crioterapia o la cirugía, al ser capaces de revertir parcialmente el proceso de carcinogénesis en las áreas circundantes a las queratosis actínicas clínicamente expresadas (tabla 1).

	Tratamiento lesiones aisladas	Tratamiento campo cáncerización	Nivel de evidencia	Grado de recomendación
Crioterapia	+		2++	B
Láseres ablativos	+		2-/3	D
Otros ttos. ablativos	+		4	D
5-fluorouracilo tópico	+	+	2++/1-	B
Imiquimod tópico		+	1++	A
Diclofenaco 3% tópico		+	2++/1+	A
Ingenol mebutato tópico		+	1++	A
TFD con luz roja		+	1+	A

Tabla. 1 Niveles de evidencia científica y grados de recomendación sobre la eficacia de distintos tratamientos de las QA (Serra, Longo y Fdz.-Guarino, 2015) (62).

Por ello en la actualidad nos referimos a los tratamientos para las QA distinguiendo entre los orientados al tratamiento de campo y los dirigidos al tratamiento particular de cada lesión.

A.1.d.1. Crioterapia

Es la modalidad más empleada de entre las orientadas a tratar lesiones aisladas. Se considera un tratamiento de primera línea para las queratosis actínicas en este enfoque, con tasas de respuesta de hasta el 99%(63). Consiste en la aplicación de nitrógeno líquido con un dispositivo que permita controlar el alcance en profundidad del tratamiento, para producir una necrosis por congelación en la epidermis ocupada por la queratosis actínica. Se aplica en espacios de unos 10 segundos y pueden realizarse dos ciclos consecutivos de congelación-descongelación para aumentar su eficacia.

Es una opción terapéutica de gran valor por su facilidad de aplicación en la propia consulta. Produce un dolor tolerable, y tras la resolución de la necrosis epidérmica, un resultado cosmético bueno. Además de eficaz por sí mismo, se ha estudiado su eficacia en combinación con tratamientos tópicos(64)(65).

A.1.d.2. Láseres ablativos

La dermabrasión con láser se ha empleado sobre todo en la reparación de la superficie cutánea facial con fines estéticos, aunque también ha encontrado su aplicación en el tratamiento de las queratosis actínicas. Los láseres ablativos más empleados son el de dióxido de carbono (CO₂) y el erbio:ytrio-aluminio-granate (Er:YAG) . Varios estudios en la literatura reportan unas tasas de eficacia de entre el 50 y el 100%, aunque la evidencia disponible es controvertida y es un tratamiento quirúrgico no exento de efectos adversos: produce grandes superficies de necrosis epidérmica facial que precisan de muchos cuidados y largos tiempos de recuperación, y a veces genera complicaciones cutáneas inestéticas irreversibles (66) (67).

A.1.d.3. Otros tratamientos ablativos

Se han empleado otras técnicas de destrucción de QA como el curetaje, ventajoso sobre las demás porque permite el análisis histológico de la muestra, o la dermabrasión química con ácido tricloroacético al 30% (68), cloruro férrico al 20%, nitrato de plata, o física mediante electrodesecación. Son procedimientos de segunda línea, orientados a lesiones aisladas y sin estudios relevantes de eficacia (40).

A.1.d.4. 5-fluorouracilo tópico

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un antimetabolito cuya acción es bien conocida. Este antagonista de la pirimidina entra en la célula, se ribosila y fosforila, pasando a asemejarse a los nucleótidos naturales. Posteriormente, el 5-FU se une al enzima timidilato sintasa, inhibiéndola, de tal manera que se produce una depleción de timina. Esta disminución en timina lleva a una

disminución en la síntesis de ADN y por tanto reducción de la proliferación y muerte celular. La interferencia del 5-FU es a nivel de la replicación, los tejidos con una proliferación más intensa sufren un mayor efecto citotóxico (69).

Se ha empleado tradicionalmente como tratamiento de campo de cancerización para las queratosis actínicas, a una concentración del 5%, prescrito como fórmula magistral en el caso de España. Recientemente ha comenzado a comercializarse una combinación de 5-FU al 0,5% con ácido salicílico al 10%, orientada al tratamiento sencillo de lesiones individuales (70). Se obtienen reducciones medias del número de lesiones en torno a 79,5% con 5-FU al 5%, y de 81,5% con concentraciones de 0,5% (69) (71).

A.1.d.5. Imiquimod tópico

Es un derivado de las imidazoquinolinas en preparado comercial al 5% o al 3,75% para su aplicación tópica. Se emplea eficazmente en el tratamiento del campo de cancerización con tasas de respuesta completa, en su preparación al 5%, del 55% y parcial del 65%(72). El preparado al 3,75% ha demostrado reducir en un 90% el número máximo de lesiones presentes durante el tratamiento (73).

El mecanismo de acción mejor conocido de imiquimod es su activación del sistema inmune innato, que ejerce a través de su capacidad agonista de los receptores toll-like (TLR) 7 y 8(74). Las vías de señalización desencadenadas por la estimulación de TLR-7 generan la activación del factor de transcripción nuclear NF-kappaB, que induce la síntesis de las citoquinas proinflamatorias IFN- α , TNF- α , IL-2,6,8 y 12, GCSF, GMCSF o las quimioquinas CCL3, 4 y 2. En conjunto esta reacción favorece una intensa respuesta inmune celular de patrón predominante Th1 que activa linfocitos citotóxicos antitumorales. Otros efectos paralelos descritos (74):

- Induce la activación de las células dendríticas, estimulando la presentación de antígenos antitumorales, y las células de Langerhans, favoreciendo su migración a los ganglios linfáticos.
- Estimula la síntesis de 2'5'-adenilatosintasa, a su vez responsable de la activación de linfocitos NK y de la expresión de perforinas en los T citotóxicos
- Estimula la síntesis de anticuerpos en los linfocitos B. Esta función normalmente está mediada por respuestas inflamatorias de patrón Th2, pero imiquimod es capaz de imitar la acción de CD40.
- Finalmente, parece inducir directamente la apoptosis de células tumorales aunque no está clara la vía por la que se genera este efecto.

A.1.d.6. Diclofenaco tópico

Este antiinflamatorio no esteroideo está disponible para el tratamiento de las QA en un preparado comercial al 3% combinado con ácido hialurónico al 2,5%. La tasa de respuesta completa se sitúa en torno al 30-58%(75); sin embargo en un metanálisis reciente comparando todos los tratamientos para las QA, el diclofenaco tópico resultó el menos eficaz(76). La actividad antitumoral del diclofenaco tópico 3% en HA 2,5% se ejerce mediante la inhibición de la enzima COX-2 que media la síntesis de varias prostaglandinas, de las cuales la más relevantes es PGE2, como se ha explicado previamente.

Diclofenaco 3% en gel ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de las queratosis actínicas leves y moderadas, y su campo de cancerización, sobre todo en su capacidad para inducir apoptosis, tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca mediada por ligandos pro-apoptóticos(77). En otro estudio(78) se han demostrado los efectos antiproliferativos del diclofenaco tópico mediante la detección por inmunohistoquímica de un marcado descenso en los marcadores de proliferación celular Ki-67 y p63. Otros estudios más recientes demuestran la eficacia proapoptótica de diclofenaco 3% tópico mediante la activación de la vía intrínseca(79) y extrínseca(80).

A.1.d.7. Ingenol Mebutato tópico

Ingenol mebutato es un principio activo vegetal procedente de la savia de *Euphorbia peplus*. Se emplea como tópico en dos concentraciones diferentes para su aplicación en cara o cuerpo. Destaca por su corto esquema de tratamiento (3 días), con efectos adversos locales similares a otras terapias como el imiquimod o el 5-FU y tasas de eficacia del 42 y 34% en cara y tronco(81) respectivamente, remisiones que se mantienen en su mayoría al año de tratamiento(82).

El ingenol mebutato tiene un mecanismo de acción dual, que es directo, mediante necrosis celular, e indirecto a través de una respuesta inflamatoria específica que contribuye a la destrucción de la QA. En su forma de acción directa, se ha observado que, en pocas horas, el ingenol mebutato provoca la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial que se sigue de su destrucción, de la de otras organelas y finalmente de la destrucción de la membrana citoplasmática. Esta forma de acción no parece estar mediada por apoptosis, aunque se desconoce el mecanismo exacto (83).

En su forma de acción indirecta, genera una respuesta neutrofilica intensa probablemente desencadenada por liberación de citoquinas proinflamatorias de las células en necrosis. Además, se ha observado que ingenol mebutato produce un aumento de la producción de anticuerpos

contra queratinocitos displásicos por parte de linfocitos B, que facilita la fagocitosis por neutrófilos de estas células. En modelos murinos deficientes en neutrófilos y linfocitos B -en el contexto de inmunodeficiencia combinada severa- se ha observado que el ingenol mebutato produce una necrosis inmediata pero las QA recidivan a partir del día 25º, lo cual sugiere que la reacción inflamatoria posterior es fundamental para evitar la recidiva de las lesiones (83).

Por último, parece que ingenol mebutato aumenta la expresión de CD80 y CD86, ambas moléculas confieren la capacidad a los linfocitos T para reaccionar contra los antígenos presentados a ellos por células presentadoras de antígenos (83).

A.1.d.8. Terapia fotodinámica

Se hablará más extensamente de este tratamiento por ser nuestro objeto principal de estudio.

A.2. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica es uno de los tratamientos más eficaces para las queratosis actínicas. Este tratamiento consiste en la aplicación de un fotosensibilizante tópico, con o sin oclusión durante un tiempo, para posteriormente iluminar la zona tratada con el fotosensibilizante con una fuente de luz apropiada. La combinación del fotosensibilizante, absorbido por los queratinocitos displásicos, junto con la fuente de luz, en presencia de oxígeno, produce la necrosis selectiva de las células tumorales en QA y otras formas de cáncer cutáneo.

A.2.a. Fotosensibilizantes y fuentes de luz

Los fotosensibilizantes más empleados en dermatología son el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) y el metilaminolevulinato (MAL) en formulaciones tópicas en crema o gel. Ambas se utilizan en oclusión durante 2 horas y la pauta recomienda de tratamiento es una sesión de irradiación con luz roja que aporte una dosis de 75J/cm². También existe el ácido clorhídrico de ALA en preparados en solución o parche. El MAL se caracteriza por ser mucho más lipofílico que el ALA y tiene una especificidad 9 veces mayor que éste por las células tumorales (84).

La administración exógena de 5-ALA o MAL es preferentemente captada y/o metabolizada por las células neoplásicas o preneoplásicas frente a las sanas. Estas moléculas, precursoras en la ruta sintética del grupo hemo del metabolito activo protoporfirina IX (PpIX), producen una acumulación de esta porfirina que confiere fotosensibilidad a la célula captante (fig. 11). Parece que la acumulación preferente de la PpIX en las células tumorales se debe, en parte, a diferencias en el estrato córneo en las áreas con displasia epidérmica, y también a diferencias en la actividad de las enzimas porfobilinógeno deaminasa y ferroquelatasa que favorecen la acumulación de PpIX con un rápido aumento de su concentración intracelular(85). La

acumulación intracelular de PpIX se produce en la mitocondria, la membrana citoplasmática, la envoltura nuclear y los lisosomas.

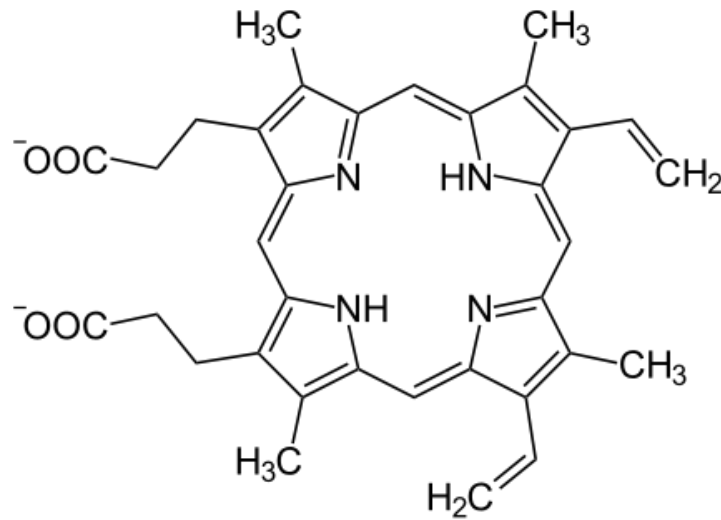


Fig. 11 Molécula de protoporfirina IX

La PpIX tiene un gran pico de absorción en 410nm y otros menores en 505, 540, 580 y 630n, y es precisamente este último el más empleado en clínica para favorecer la absorción de los fotosensibilizantes (fig. 12). Las fuentes de luz empleadas son diversas lámparas (de emisión de diodos o LEDs, láseres, luz pulsada intensa). En TFD convencional la fuente principalmente empleada es una lámpara de LEDs de luz roja que produce una banda estrecha de irradiación (630-635nm) que es capaz de tratar zonas extensas con la dosis de irradiación adecuada de forma eficiente (85) (fig. 13).

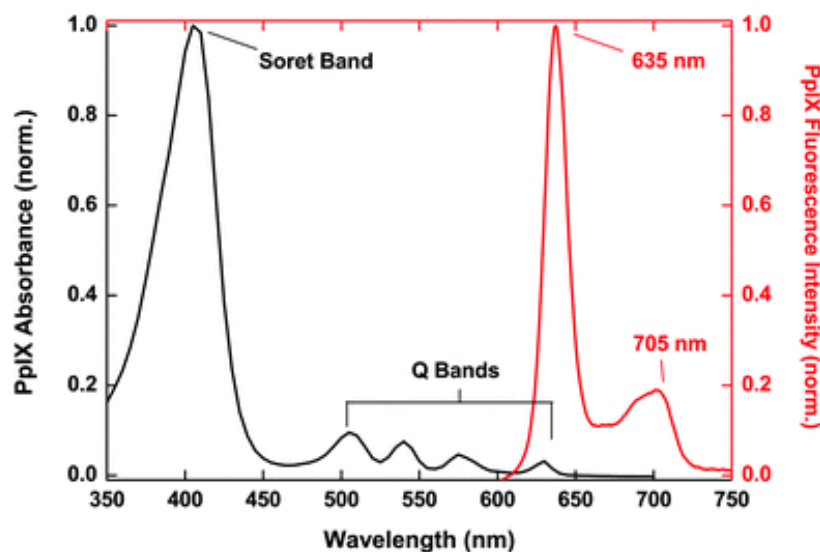


Fig. 12 Espectro de absorción y de emisión de fluorescencia de la protoporfirina IX (de Valentine et al. 2012 (86))

En los últimos años la luz de día ha cobrado importancia como fuente de luz inductora de la absorción de fotosensibilizantes, con varias ventajas para el paciente a nivel práctico. 4 ensayos controlados aleatorizados han demostrado la no inferioridad de la TFD con luz de día frente a la TFD convencional, con tasas de respuesta completa del 75,9% en QA grado I, 61,2% en grado II y algo menor (49,1%) en QA grado III (87–90). En la TFD con luz de día, el fotosensibilizante puede aplicarse sin oclusión, y el tratamiento se realiza con una exposición a luz de día de 1,5-2 horas, siempre y cuando la temperatura ambiente sea superior a 10°C y la dosis de irradiación que se reciba en el exterior supere los 8 J.cm², lo cual depende de factores meteorológicos, sobre todo la latitud y la estación del año. Esta forma alternativa de TFD es mejor tolerada por el paciente, sobre todo porque la exposición a luz transcurre casi en total ausencia de dolor, principal efecto adverso de la TFD convencional.



Fig. 13 Paciente recibiendo TFD para las QA de su cuero cabelludo con lámpara de luz roja de LEDs

A.2.b. Mecanismos de destrucción tisular inducidos por la TFD

La eficacia de la TFD se relaciona con la muerte celular directa, y tiene otros efectos indirectos relacionados el daño vascular, la inflamación y la respuesta inmunitaria del huésped.

Daño directo

Por la absorción de luz, el fotosensibilizante pasa de su estado basal a un estado electrónicamente excitado e inestable. La PpIX en estado triplete interacciona con las moléculas circundantes produciendo dos tipos de reacciones foto-oxidativas:

-reacción fotooxidativa de tipo I por transferencia de electrones, con generación de reacciones en cadena mediadas por radicales libres de oxígeno (ROS)

- reacción fotooxidativa de tipo II por transferencia de energía, con retorno de la PpIX a su estado singlete y de ahí al estado basal. Aunque ambas reacciones ocurren en competición, parece que la segunda es responsable de un mayor daño tisular.

La PpIX es una molécula muy reactiva que interacciona con muchos tipos de biomoléculas, sobre todo a nivel de las membranas celulares: colesterol, lípidos y varios aminoácidos de especial sensibilidad (91). Parece que la acumulación del fotosensibilizante a nivel de la membrana induce necrosis celular, mientras que en la mitocondria desencadena apoptosis. Esto depende del precursor empleado del fotosensibilizante: ALA hace que la producción endógena de PpIX se concentre más en la mitocondria, mientras que otros precursores de carácter aniónico favorecen la acumulación de PpIX en los lisosomas. También depende del tiempo de incubación del precursor, ya que según el tiempo que haya transcurrido entre su aplicación y la irradiación, se observa localización preferente de la PpIX en unas estructuras celulares o en otras. Otros factores que influyen son el tipo de célula y la dosis de luz administrada, ya que dosis más bajas favorecen in vitro la muerte por apoptosis, mientras que dosis más altas se asocian a necrosis celular (92).

Daño indirecto

La vascularización parece ser la diana más importante del daño indirecto producido por la TFD, puesto que el daño directo producido por la PpIX provoca, a nivel del endotelio vascular, hipoxia y privación de nutrientes a las células tumorales (93). Además se han descrito varios efectos reguladores sobre la matriz extracelular, como activación de las metaloproteinasas 1, 3, 8 y 9 y reducción de la expresión de sus inhibidores, los TIMPs (92).

Es de gran importancia entre los efectos producidos por la TFD su activación del sistema inmune innato y específico. El daño directo producido por las reacciones fotooxidativas a nivel de la membrana produce una masiva liberación de fragmentos lipídicos y ácido araquidónico, del que se sigue la liberación de varias moléculas implicadas en la inmunidad innata: reactantes de fase aguda, sustancias vasoactivas, interleucinas y factores de necrosis tumoral. Se ha demostrado la producción de interleucinas IL-6, IL2, IL1b y TNF- α , y G-CSF con fotosensibilizantes porfirínicos (94). Este microambiente induce la quimiotaxis de mastocitos y posteriormente de células del sistema monocito-macrófago, que fagocitan los restos celulares tumorales y posteriormente son capaces de presentar antígenos tumorales a los linfocitos, iniciándose por tanto una respuesta inmune específicamente dirigida contra las células inicialmente dañadas de forma directa por la TFD (95).

A.2.c. Eficacia y efectos adversos

La TFD en QA ha demostrado tasas de respuesta completa del 86-89% en QA de grado leve y moderado a los 3 meses de tratamiento, aunque se reduce al 68% a los 12 meses en el tratamiento de las queratosis actínicas. Se han descrito diversas limitaciones a la eficacia del tratamiento. En primer lugar el tamaño: un estudio piloto ha mostrado que las QA mayores de 10mm y con mayor severidad histológica responden peor (96). También la localización, ya que en zonas acras como manos y pies, se ve reducida la eficacia del tratamiento en aproximadamente un 10%, lo cual se cree relacionado con lesiones más gruesas en estas localizaciones; de hecho se ha demostrado una menor acumulación de PpIX en QA de zonas acras (97).

Además de un tratamiento para las QA, diversos estudios en modelos murinos (98)(99), y posteriores ensayos clínicos(100)(101), reportan la eficacia del tratamiento del campo de cancerización con TFD como prevención en el desarrollo de cáncer cutáneo. La TFD ha demostrado ser capaz de revertir diversos marcadores de proliferación presentes en el campo de cancerización como ki67 y p53(102), contribuyendo a la normalización de la epidermis.

Entre sus efectos adversos figura el dolor durante la exposición a la fuente de luz y el desarrollo de inflamación, exudación y costras en la piel lesional tratada; por otro lado, destaca por ofrecer un excelente resultado cosmético.

A.3. Vitamina D

A.3.a. Metabolismo de la vitamina D

La vitamina D (VD) es una prohormona liposoluble cuya principal función biológica es el mantenimiento de la homeostasis del fósforo y del calcio séricos (fig.14). Actúa a varios niveles en el metabolismo de estos elementos: en el intestino, promueve la absorción de calcio, en el riñón estimula su reabsorción para reducir su pérdida tras el filtrado glomerular, y en el hueso ejerce una acción dual: contribuye a aumentar los depósitos de este mineral en el compartimento óseo, al inducir la formación de nuevo hueso, aunque en cantidades muy altas también puede promover la resorción ósea. Por último, ejerce un efecto regulador sobre las glándulas paratiroides al inhibir la síntesis de hormona paratiroidea.

Su síntesis a partir del colesterol de la dieta, mediada por la luz solar, sigue un proceso bien conocido. Tras varias transformaciones del colesterol generado en el hígado se produce 7-dehidrocolesterol. En la piel sometida a RUV éste se transforma en colecalciferol o vitamina D3. Esta prohormona, necesita aún dos hidroxilaciones para pasar a su forma activa: en el

hígado se transforma en 25-hidroxicolecalciferol por la acción de la 25-hidroxilasa, y éste, en el riñón, en 1,25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol, forma activa de la vitamina D (VD), por acción de la 1- α -hidroxilasa (fig. 15). Una pequeña parte de la VD activa en forma de colecalciferol se obtiene a partir de su consumo en alimentos de origen animal, siendo los alimentos más ricos en ella algunos pescados azules y la yema de huevo (tabla 2). Otra forma de pro-VD, el ergocalciferol, se encuentra en pequeñas cantidades en alimentos de origen vegetal. Además, actualmente muchos alimentos procesados, sobre todo de tipo lácteo, se enriquecen con suplementos de VD.

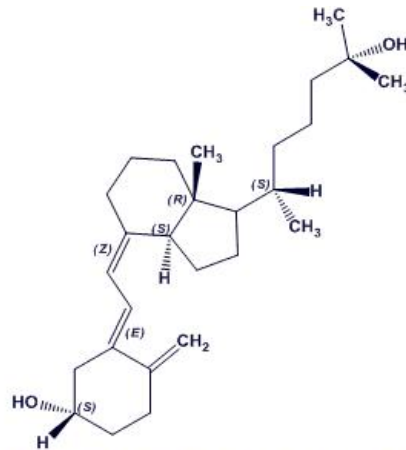


Fig. 14 Molécula de 1,25-dihidroxicolecalciferol

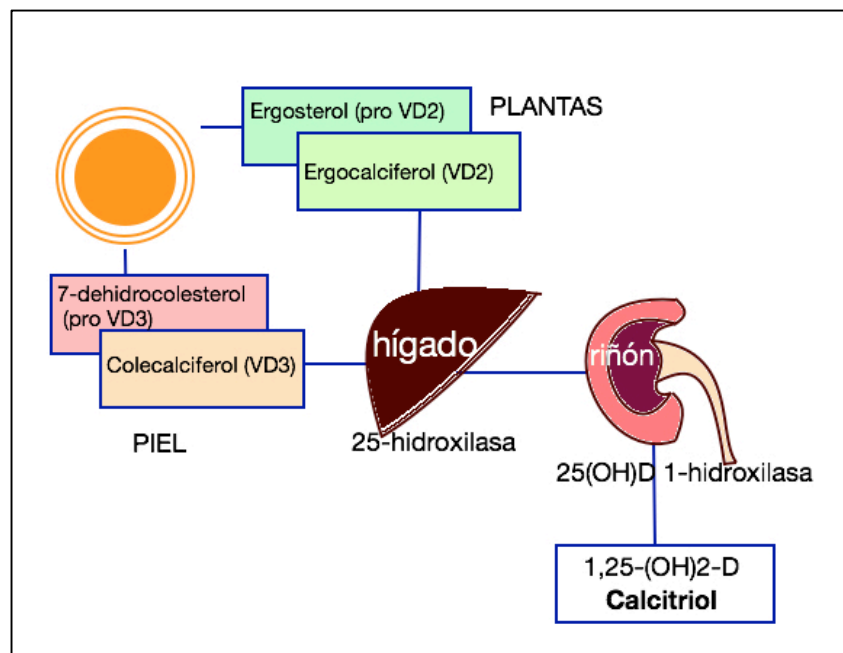


Fig. 15 Síntesis de la vitamina D a partir de la exposición solar y los alimentos

Fuente	Contenido en vitamina D
Salmón fresco silvestre 100g	600-1000 UI vitamina D3
Salmón fresco de cultivo 100g	100-250 UI vitamina D2 o D3
Salmón enlatado 100g	300-600 UI vitamina D3
Sardinas enlatadas 100g	300 UI vitamina D3
Arenque enlatado 100g	250 UI vitamina D3
Atún enlatado 100g	230 UI vitamina D3
Aceite de hígado de bacalao, 1 cucharada	600-100 UI vitamina D3
Champiñones frescos 100g	100 UI vitamina D2
Champiñones secados al sol 100g	1600 UI vitamina D2
Huevos c/u	20 UI vitamina D2 o D3
Exposición solar UVB 10 minutos	3000 UI vitamina D3

Tabla. 2 Aporte de VD de determinados alimentos frente a la síntesis de vitamina D por exposición a UVB(103)

A.3.b. Receptor de la vitamina D

En sangre, la VD es transportada a través de la proteína de unión a VD (VDBP por sus siglas en inglés); penetra en las células, presumiblemente por difusión, y se une a su receptor (VDR). El VDR está presente en la mayoría de tejidos y células del organismo. Es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de esteroides y actúa heterodimerizando con un receptor X de retinoides, promoviendo la transcripción de más de 200 genes, y produciendo así una amplísima variedad de efectos biológicos: son bien conocidas su influencia en la inhibición de la proliferación celular y de la angiogénesis, la inducción de la diferenciación terminal o la estimulación de la síntesis de insulina(104).

El gen del VDR es relativamente grande (>100kb), está localizado en el cromosoma 12q12-14 y se compone de dos regiones promotoras, ocho exones y seis regiones no codificantes(105) (fig.7). Hasta el momento se conocen más de 60 polimorfismos del VDR, localizados tanto en las regiones promotoras como en los exones, y se ha estudiado la posible relación de esta variabilidad genética en el desarrollo de varias enfermedades, incluido el cáncer de piel(106).

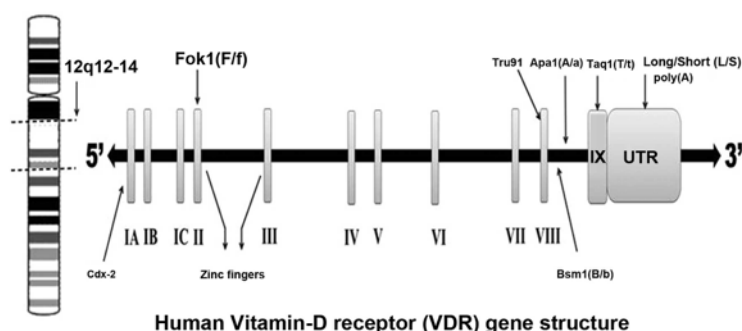


Fig. 7 Gen del receptor de la VD en el brazo largo del cromosoma 12

Además de la variación genética del VDR, regulador clave en la acción de la VD, también han cobrado importancia en estudio sobre la influencia de la VD en diferentes enfermedades otros genes relacionados con la acción de la vitamina D: el gen CYP2R1(107) que codifica para la enzima 25-hidroxilasa, CYP27B1(108) para la 1- α -hidroxilasa, CYP24A1 que degrada la 1,25-VD en 24,25-VD, el gen de la proteína de unión a VD(109) (VDBP -*vitamin D binding protein*- o GC -*group-specific complement*- por sus siglas en inglés), y una región del cromosoma 11 que contiene los genes DHCR7 (7-dehidrocolesterol reductasa) y NADSYN1 (NAD sintetasa). Publicaciones recientes han hallado una fuerte asociación entre polimorfismos en estos genes y el riesgo de presentar deficiencia de VD(110)(111).

A.3.c. Fisiopatología de la vitamina D

La deficiencia de VD produce cuadros patológicos debidos a la deficiente mineralización ósea. Al disminuir la absorción intestinal y la reabsorción renal de calcio, la paratohormona (PTH) produce resorción ósea estimulando a los osteoclastos para degradar hueso y liberar calcio a la sangre. En los niños este fenómeno produce la grave enfermedad llamada raquitismo, caracterizada por un retraso generalizado en el desarrollo, con hipotonía muscular, y deficiencias y deformaciones en la dentición y la estructura ósea, sobre todo el engrosamiento de las epífisis de los huesos largos y la deformación curva de los mismos al soportar el peso del niño en condiciones deficientes de densidad y resistencia. En los adultos, la deficiencia grave de VD produce, por la misma vía, un cuadro generalizado de pérdida de densidad ósea con dolor, alteraciones de la postura y deformidades menos evidentes que en el raquitismo, llamado osteomalacia.

Además, la deficiencia de VD se ha relacionado con varias otras patologías en distintos aparatos y sistemas. Es un factor de riesgo para el desarrollo de demencia(112), particularmente en enfermedad de Alzheimer(113). También está implicada en el desarrollo de depresión(114). Por las propiedades inmunomoduladoras de la VD, su deficiencia parece estar asociada a una activación del sistema inmune, mecanismo que subyacería en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 (115), la artritis reumatoide (116), la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (117), el lupus eritematoso sistémico (118) o la esclerosis múltiple (119). A nivel pulmonar, la deficiencia de VD es común entre enfermos con patología del tracto respiratorio inferior. La evidencia disponible sugiere que las exacerbaciones del asma son más frecuentes y de peor control bajo niveles de deficiencia de VD(120) y que su suplementación contribuye a la estabilización de la enfermedad(121). También está implicada

en el desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva y tuberculosis (122). Su papel en determinadas formas de cáncer se discute específicamente en el apartado A.3.d.

A día de hoy se sigue discutiendo cuáles son los niveles óptimos de VD en sangre. Se sabe que el raquitismo no se manifiesta a menos que los niveles de 1,25-(OH)₂D desciendan por debajo de 15 ng/ml. No obstante, atendiendo a la normalización de los niveles de PTH, se ha redefinido la deficiencia de VD en niveles en sangre de 1,25-(OH)₂D menores de 20 ng/ml. Recientemente se ha reevaluado de forma global el nivel en sangre de VD junto con la fuerza muscular, el riesgo de fractura y algunas enfermedades crónicas no relacionadas con el metabolismo del calcio, observándose que eran necesarios niveles mayores de VD para garantizar la salud en estos aspectos. En sus guías de práctica clínica para la prevención de la deficiencia de la VD la Endocrine Society ha categorizado en varios rangos el estatus de VD (tabla 3), estableciendo los niveles óptimos en 30-60 ng/ml:

Niveles en sangre de 1,25-(OH) ₂ D	Definición
<20 ng/ml	Deficiencia
20-29 ng/ml	Insuficiencia
>29 ng/ml	Suficiencia
30-60 ng/ml	Rango óptimo
> 100 ng/ml	Rango no tóxico

Tabla 3: Niveles saludables y deficientes de vitamina D según la Endocrine Society(123)

Tomando como referencia estos parámetros, infinidad de trabajos de investigación en los últimos años han concluido que el déficit moderado o insuficiencia de VD es un problema de salud pública global en individuos sanos a todas las edades(124) y esto ha llevado a una explosión investigadora sobre el status de vitamina D y la salud en general.

Según Michael F. Holick, uno de los mayores expertos en VD en el mundo, una exposición solar “sensata” (descubrir cara, brazos y manos durante 5-10 minutos diarios, o fórmulas equivalentes a ésta) y un incremento en el consumo de alimentos frescos ricos en VD y procesados enriquecidos en ella, deberían bastar como estrategias globales para combatir esta “pandemia”(125).

A.3.d. Relación entre la vitamina D y el cáncer

Actualmente se discute el papel de la VD en el cáncer humano, ya que numerosas publicaciones han comunicado asociación entre niveles bajos de vitamina D y mortalidad global(126), mortalidad por cáncer(127) y supervivencia al cáncer(128)((129). Sin embargo, la asociación no permite aclarar si existe una relación causal.

Diferentes niveles de evidencia soportan la relación entre VD y cáncer(130). No sólo niveles bajos de VD circulante asocian mayor riesgo de desarrollar cáncer, sino que también dietas con alto contenido en VD asocian un riesgo reducido del mismo cáncer. La agresividad de las neoplasias es más baja durante el verano, momento en que la síntesis de vitamina D es mayor, y además polimorfismos de varios genes implicados en el sistema endocrino de la VD se han hallado asociados, con significación estadística, a diferentes tipos de cáncer (131).

El VDR es una molécula ubicua en el organismo, al estar expresado en gran variedad de tipos celulares y tejidos, y capaz de generar multitud de efectos biológicos genómicos y no genómicos. Su importancia como regulador del crecimiento y la diferenciación celular proviene de la creciente evidencia científica que prueba que su activación es capaz de detener el crecimiento celular, favorecer la diferenciación, inducir la apoptosis e inhibir la neoangiogénesis(130). Además, tiene un importante papel a nivel del sistema inmune, induciendo una respuesta del rechazo tumoral.

Por otro lado, aunque no está clara, se presume una relación entre vitamina D, inflamación – entendida como respuesta inmune mantenida en el tiempo- y cáncer. La inflamación crónica está implicada en el desarrollo y progresión de varias formas de cáncer(132). Estudios recientes han destacado la importancia de diversos procesos inmunitarios e inflamatorios en la génesis de las neoplasias de estómago, hígado, colon y próstata(133). El VDR está presente de forma casi constante en el sistema inmune, y los efectos secundarios a su activación son variados(134): modula la respuesta inmune de los linfocitos T y B; influye sobre los linfocitos CD4 inhibiendo la proliferación de células Th1 y favoreciendo una respuesta inmune Th2 ; modula la respuesta de los linfocitos Th17; disminuye la producción de autoanticuerpos; inhibe la secreción de IL-12 y la diferenciación de monocitos a células dendríticas; favorece la fagocitosis bacteriana por macrófagos, inhibiendo la liberación de citoquinas inflamatorias por parte de éstos, etc. Estos efectos de la VD son posibles porque la mayoría de células del sistema inmune expresan el VDR.

Varios polimorfismos del VDR han mostrado asociación significativa con diferentes formas de cáncer, según ha reportado una revisión reciente(131). Los autores concluyen que, aunque determinados polimorfismos modulan el riesgo de cáncer, probablemente interactúan con otros factores del sistema endocrino de la vitamina D como la calcemia, la exposición solar o el nivel basal de VD plasmática. Los resultados de esta revisión están recogidos en la tabla 4.

	Bsm 1	Taq 1	Fok 1	Apa1
Cáncer de mama	X		X	X
Cáncer de próstata	X	X	X	
Cáncer de piel	X	X	X	
Cáncer colorrectal	X	X	X	

Tabla 4: Asociación de polimorfismos conocidos del VDR y su relación con varios cánceres humanos (Gandini et al. 2014) (131)

Otras neoplasias, como el cáncer de riñón, han mostrado asociación a polimorfismos concretos en estudios de menor calidad de evidencia(135).

A.3.e. Relación entre la vitamina D y la carcinogénesis cutánea

A.3.e.1. Estudios in vitro y en modelos animales

La VD y la interacción con su receptor, el VDR, actúan como supresores de tumores cutáneos a través de una diversidad de efectos biológicos. En primer lugar, tienen un **papel regulador sobre la proliferación queratinocítica**, como prueba el hecho de que los queratinocitos *knock-out* para el VDR son hiperproliferativos y muestran una capacidad reducida de entrar en apoptosis, tal y como se ha demostrado en modelos murinos con esta alteración genética (136). No se conocen con exactitud los mecanismos por los que la interacción VD/VDR regula la proliferación queratinocítica. Se ha demostrado que VD favorece la supervivencia celular regulando los niveles celulares de $\Delta Np63\alpha$, protooncogen sobreexpresado en el CCNM(137). Se ha descrito que VD/VDR interactúa recíprocamente con β -catenina para controlar la proliferación de los queratinocitos epidérmicos y promover su diferenciación (138).

Más recientemente se ha descrito que el VDR puede ser estimulado por secosteroides análogos de la 1,25-(OH)₂D, (20(OH)D₃, 22(OH)D₃, 20,23(OH)₂D₃, 20,22(OH)₂D₃ y 17,20,23(OH)₃D₃), sintetizados endógenamente por mediación de CYP11A1 y CYP27B1, que tienen una intensa afinidad por el VDR (aunque menor que la 1,25(OH)₂D) (139). Estos análogos de la VD pueden además actuar como antagonistas de los receptores ROR α y ROR γ , expresados en queratinocitos(140). Este hallazgo aporta una vía alternativa por la cual la vitamina D puede ejercer sus múltiples y complejas funciones en la epidermis.

Otro efecto conocido de la interacción VD/VDR sobre la proliferación queratinocítica es su inhibición de la vía de señalización de hedgehog(141), una cascada de transducción de señales clave en el desarrollo del CBC. Se ha probado que los queratinocitos del CBC expresan el VDR(142), y se ha encontrado relaciones entre diferentes componentes del sistema metabólico de la VD y la actividad proliferativa y de diferenciación en estos tumores(143), por lo que se sospecha que la VD tiene una importancia central en el crecimiento del CBC. En ratones *knock-out* para el VDR expuestos a un carcinógeno oral se ha observado mayor incidencia de CBC que en congéneres sanos para el mismo gen(144). Un estudio similar ha demostrado mayor

incidencia tanto de CBC como CEC en ratones con el mismo defecto genético de VDR en el cromosoma 12 expuestos a RUV(145). También se ha observado en ratones con CBC que la aplicación tópica de VD en los tumores inhibe la proliferación celular y reduce la transcripción de ARNm de Gli1, molécula señalizadora de la cascada de hedgehog(146).

La VD demuestra tener un efecto protector al **evitar la formación en el ADN de mutaciones inducidas por RUV**, como se ha demostrado in vitro en varios trabajos(145,147). La VD inhibe, no sólo la formación de las formas de fotodaño sobre el ADN más frecuentes, los dímeros de ciclobutano(145), sino también la aparición de 8-oxo-2-desoxiguanosina, producida por el estrés oxidativo, y de 8-nitroguanosina(148). Al menos parte de su efecto protector del ADN se debe a su capacidad de disminuir la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. En queratinocitos *knock-out* para el VDR se reduce el aclaramiento de estas mutaciones inducidas por RUV. Además de sus efectos genómicos directos, VD induce la expresión de dos genes relevantes en la reparación del ADN: XPC y XPE(149).

La acción de la VD sobre p53 determina su **capacidad de promover la reparación de las células mutadas** (150). La proteína supresora tumoral p53 ejerce un papel central en la respuesta al daño sobre el ADN (véase “efectos directos de la RUV sobre el ADN” en el epígrafe A.1.c.4.) La exposición solar induce en los queratinocitos la acumulación nuclear de p53, que es máxima a las 12h de exposición a la RUV(151). Se ha demostrado que la administración de VD previa a la exposición solar aumenta en varias veces la concentración intranuclear de p53(147), favoreciendo la reparación del ADN sobre la apoptosis de las células mutadas.

Una cuarta vía por la cual la VD parece ser capaz de proteger frente a la fotocarcinogénesis está relacionada con su **regulación de la expresión de los ARN largos no codificantes** (ARNlnc). Estas cadenas de ARN que suponen más del 80% del transcriptoma son importantes reguladores epigenéticos de la pluripotencialidad embrionaria y la diferenciación celular. Algunos ARNlnc se han implicado en el cáncer por su relación con la inmortalidad replicativa, angiogénesis y mecanismos de invasión tisular(152); otros ARNlnc parecen asociarse a supresión tumoral. Puede ser que el VDR favorezca la expresión de ARNlnc asociados a supresión tumoral e inhiba la expresión de aquellos de perfil oncogénico(153).

A.3.e.2. Estudios clínicos

El papel de la VD en el cáncer cutáneo es particularmente controvertido, al darse la circunstancia de que la fracción luz ultravioleta más adecuada para la síntesis de VD (290-320nm) es también el principal factor de riesgo ambiental para el desarrollo de cáncer cutáneo

(fig.16). Esta realidad sitúa a la exposición solar como factor de confusión en los estudios epidemiológicos sobre vitamina D y neoplasias cutáneas.

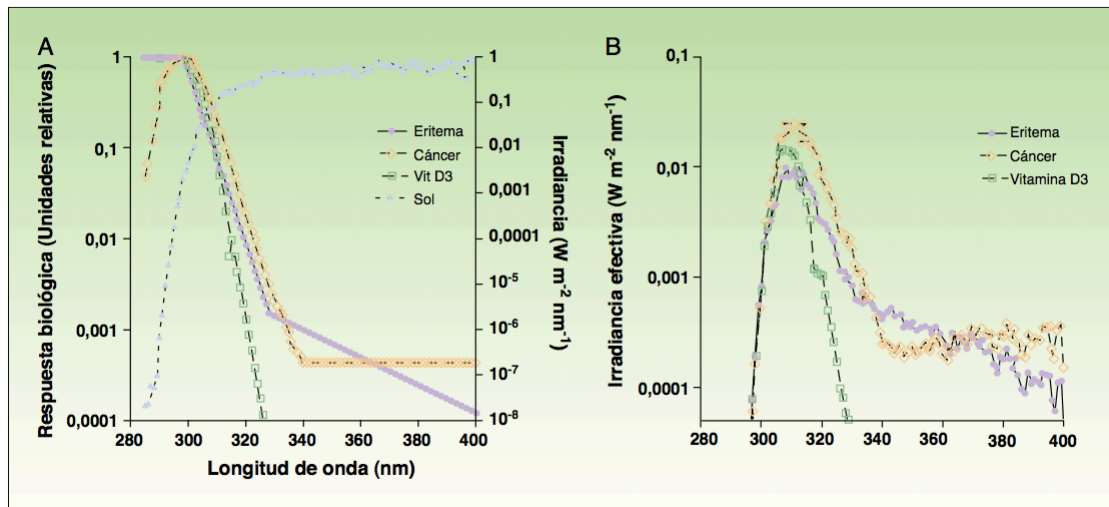


Fig. 16 Relación entre la longitud de onda del espectro solar, la síntesis de VD y el desarrollo de eritema solar y cáncer cutáneo (Gilaberte et al. 2011) (154)

La discusión en las últimas tres décadas sobre si **la fotoprotección influye en el estatus de VD** se basa en evidencia científica a favor y en contra de esta hipótesis. Se acepta que el uso de fotoprotectores tópicos de factor alto en cantidades estandarizadas, en estudios donde su aplicación se supervisa, particularmente en pacientes de fototipos claros, sí asocia significativamente un mayor riesgo de insuficiencia de VD(155), aunque el uso de fotoprotector tópico en condiciones reales hace que estas diferencias sean poco relevantes como para dar importancia a este efecto(156). Sin embargo, la evitación de la exposición solar directa al procurar la sombra y la cobertura de superficie corporal con ropa sí reducen los niveles de VD (157). Parece prudente recomendar fotoprotección para evitar el poder carcinogénico de la RUV, y supervisar el estatus de VD intentando adecuarlo a niveles sanos con la ayuda de la dieta y los suplementos.

En cuanto a si **existe una relación entre los niveles de VD y el desarrollo de CCNM**, los estudios clínicos parecen conceder a la VD un papel relevante tanto a nivel de CBC como de CEC. En un estudio de casos-contróles sobre varones ancianos con (N=178) y sin (N=930) CCNM pertenecientes al estudio MrOS (Fracturas Osteoporóticas en Varones), los hombres con mayor nivel basal de VD (>30 ng/ml) presentaban una probabilidad 47% menor de CCNM (IC 95% 0,3-0,93) frente a los de menor nivel basal(158). Por el contrario, en otro estudio de casos-contróles, los pacientes con mayor nivel plasmático basal de VD presentaban un pequeño aumento de riesgo de CBC(159). También fue observado un incremento de riesgo de CCNM en pacientes con niveles altos de VD en un estudio prospectivo de cohortes realizado sobre 3223 pacientes blancos que consultaban por osteoporosis en un programa de mantenimiento de la

salud. En este mismo estudio, por otro lado, niveles de VD sanguínea menores de 15 ng/ml mostraron una asociación con el riesgo de desarrollo de CEC aunque no significativo. No se ha publicado ningún estudio que examine específicamente la relación entre una deficiencia de VD en el tiempo y el desarrollo de QA. En resumen, tomada en su conjunto, la evidencia clínica existente sugiere que la VD previene el desarrollo de CCNM aunque son necesarios más estudios prospectivos en humanos para definir adecuadamente esta relación.

También se ha investigado en estudios clínicos la **relación de diferentes polimorfismos del VDR con el desarrollo de CCNM**, aunque hasta el momento las posibles asociaciones no han sido bien caracterizadas. Un estudio en 142 pacientes polacos con CBC y el mismo número de controles sanos(160), que estudiaba los polimorfismos *Taq I*, *Apa I*, *Fok I* y *Bsm I* mostró que el genotipo TT del gen *Fok I* aumenta el riesgo de desarrollo de CBC (OR = 10,14, P>0,001). También los genotipos *Apa I* GT y *Taq I* TT y TC mostraron asociación aunque con menores OR. Otro estudio alemán con 90 casos de CBC, 100 de CEC y 51 controles sanos(161), que analizó los polimorfismos *Taq I*, *Apa I* y *Bgl I*, no fue capaz de hallar ninguna asociación entre genotipos individuales del VDR y el desarrollo de CEC. Más recientemente, el genotipo recesivo en los polimorfismos rs2228570, rs927650, y *Bsm I* ha mostrado un riesgo significativamente menor de desarrollo de SCC(162). La asociación a QA se investigó determinando los polimorfismos *Taq I*, *Fok I*, *Bsm I* y *Apa I*, ya relacionados en otros trabajos con CCNM y melanoma, en 190 pacientes con QA y 190 controles pertenecientes al Nambour Skin Cancer Study(163). Los alelos de diferentes polimorfismos, por separado, no mostraron asociación con la presencia o ausencia de queratosis actínicas. Sin embargo, sí se haya asociación de la heterocigosis con la ausencia de QA y la homocigosis con la presencia de QA para las secuencias TaqI y ApaI. Se habla de “ventaja heterocigota” del VDR en su relación con el desarrollo de QA.

Todos los estudios sobre polimorfismos del VDR y el cáncer de piel sugieren que aunque algunas asociaciones entre polimorfismos y patología son consistentes, debe haber factores adicionales que influyan en la integridad del sistema endocrino de la vitamina D cutáneo y puedan por tanto influir en el desarrollo de cáncer de piel y su pronóstico.

B. Justificación, hipótesis y objetivos

B.1. Justificación

Hasta el momento sólo se ha estudiado la influencia del pretratamiento con VD en CCNM. Se ha descrito que la administración de VD (calcitriol) los días previos al tratamiento mejora la respuesta de las neoplasias y preneoplasias epidérmicas a la TFD(164). En ratones con displasia y neoplasias cutáneas, administrando vitamina D (calcipotriol y calcitriol) por vía tópica e intraperitoneal en los tres días previos al tratamiento con TFD con ALA se observó un aumento de los niveles de PpIX en las células de los tumores tratados –medido por intensidad de fluorescencia- y un aumento de la apoptosis mediada por caspasas 3 y 8 (164).

La capacidad de aumentar la síntesis de PpIX inducida por el pretratamiento con calcitriol antes de la TFD con ALA se ha probado en otras neoplasias y tejidos: adenocarcinoma mamario (135), glioma (165), e incluso en patología cutánea no tumoral como la psoriasis (166).

Un estudio más reciente (167), en el que se aplicó calcitriol tópico a ratones con CBC y CEC, previamente a tratarlos con TFD, demostró que en los tumores pretratados con VD, la PpIX aumentaba intracelularmente 64 veces en CBC y 21 veces en CEC respectivamente. El mismo estudio probó que las neoplasias pretratadas con calcitriol exhiben, tras la TFD con ALA, marcadores de diferenciación celular (E-cadherina), proliferación (Ki67) y apoptosis (TUNEL), a diferencia de las pretratadas con placebo.

Aunque queda demostrado que el pretratamiento con VD antes de la TFD con ALA, administrada a ratones tanto tópica como sistémicamente, aumenta la concentración intracelular de PpIX en el tejido neoplásico, queda por aclarar si esto también ocurre a nivel de la práctica clínica. Adicionalmente, resulta interesante explorar si sus efectos beneficiosos sobre la respuesta tumoral al tratamiento dependen sólo de dicho acúmulo de PpIX, o si otros posibles efectos celulares bien conocidos de la VD sobre la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y el sistema inmune pueden intervenir.

B.2. Hipótesis

Considerando que la administración exógena de VD en ratones incrementa la respuesta a TFD del CEC y CBC, se plantea la hipótesis de que la VD endógena probablemente influye en la respuesta del CCNM a la TFD en humanos. De este modo, los niveles de VD sérica o la expresión de su receptor en el tumor podrían ser biomarcadores con valor predictivo de la respuesta a este tratamiento, lo que permitiría aplicarlo en condiciones óptimas para incrementar su eficacia.

B.3. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar el papel de la vitamina D en la efectividad de la terapia fotodinámica con metilaminolevulinato en las queratosis actínicas.

Objetivos específicos

1. Estudiar la posible asociación de la efectividad clínica e histológica de la TFD con MAL en el tratamiento de las queratosis actínicas con los niveles de vitamina D sérica.
2. Estudiar los cambios producidos por la TFD con MAL en la expresión del receptor de la vitamina D, así como su valor como predictor de respuesta.
3. Caracterizar el papel del receptor de la vitamina D, y de los polimorfismos de su gen y los genes VDBP, CYP2R1, LRP5 y DHCR7/NADSYN en la respuesta de las queratosis actínicas a la TFD con MAL.
4. Valorar la asociación de las variables clínicas e histológicas en la respuesta de las queratosis actínicas a la TFD con MAL.
5. Investigar el efecto que la TFD con MAL tiene sobre marcadores de proliferación, apoptosis y respuesta inmunitaria en queratosis actínicas y su relación con la efectividad del tratamiento.
6. Determinar si parámetros sanguíneos relacionados con la VD (PTH, Ca y P así como los lípidos sanguíneos) se asocian con la respuesta de las QA a la TFD.

C. Pacientes y método

C.1. Diseño del estudio

Este estudio observacional prospectivo piloto evalúa la eficacia del tratamiento de las QA con TFD con MAL, y la influencia diferentes variables epidemiológicas, clínicas, histológicas, inmunohistoquímicas y bioquímicas en dicha eficacia.

El estudio fue llevado a cabo entre marzo 2014 y septiembre 2016 en las consultas de Dermatología del Hospital Universitario del Henares (Coslada, Madrid). Ante el diagnóstico clínico de QA, dermatólogos del equipo del investigador principal escogieron un tratamiento para el paciente en función de su criterio clínico. Los pacientes a los que se les prescribió tratamiento con TFD recibieron información sobre el estudio, y valorados los criterios de inclusión y exclusión, fueron incluidos con su consentimiento. Cada paciente fue evaluado, clínicamente y mediante fotografías digitales, en la visita basal y en una segunda visita de control, 6 semanas después de finalizar el tratamiento. El tratamiento consistió en todos los casos en una sesión de TFD con MAL.

En cada paciente se estableció una lesión “índice” definida como la QA de mayor grado clínico, de la que se realizó una biopsia. Entre una y tres semanas más tarde, para permitir la adecuada curación de la herida de biopsia, se realizó una extracción de sangre para determinación de niveles plasmáticos de colesterol total, lipoproteínas HDL y LDL, triglicéridos, vitamina D y paratohormona. El día de la extracción, el paciente realizaba el tratamiento con TFD. Tras seis semanas, el paciente fue reevaluado en una visita de seguimiento donde se repitieron la biopsia y la extracción sanguínea. En el periodo de observación todos los pacientes recibieron dos tubos de 50ml de un fotoprotector con FPS 50 (Heliocare 360° gel, I.F.C. Santander, España) con la instrucción de aplicárselo antes de cada salida al aire libre, aunque se les recomendó no exponerse al sol en los primeros tres días tras el tratamiento.

C.2. Selección de pacientes

Al tratarse de un estudio piloto, se contempló la inclusión inicial de al menos 30 pacientes para considerar un análisis estadístico basado en una distribución normal, válido siempre y cuando la variable cumpla con los criterios de normalidad.

Los **criterios de inclusión** fueron:

- gozar de un buen estado general de salud
- presentar QA, en la cara o el cuero cabelludo, localizadas en un campo de tratamiento (un área rectangular de 21 x 9cm)
- ser capaces de cumplir por si mismos, o con supervisión cercana, las pautas de tratamiento y la recogida de datos para el estudio.

Fueron descartados para participar en el estudio los pacientes que cumplieran alguno de los siguientes **criterios de exclusión**:

- condiciones médicas inestables (tales como cáncer o inmunosupresión)
- pacientes con hipersensibilidad documentada al MAL usado en el estudio
- pacientes con contraindicaciones médicas para el tratamiento (p. ej. mujeres embarazadas, patología fotosensible como lupus eritematoso o porfiria, medicación fotosensibilizante)
- pacientes que hubieran recibido tratamientos para las queratosis actínicas del área seleccionada en los 6 meses previos a la inclusión.

C.3. Procedimiento del tratamiento fotodinámico

La preparación del paciente para la terapia fotodinámica consistió en la eliminación cuidadosa de la hiperqueratosis de las lesiones mediante abrasión con papel de lija o curetaje, y a continuación la aplicación de una capa de 1mm de metilaminolevulinato en crema (Metvix crema 160mg/g; Galderma, Paris, Francia) sobre cada queratosis actínica y 1cm alrededor, repartiendo la cantidad restante del producto en el campo de cancerización circundante. El área a tratar se ocluía con una capa plástica y un apósito oclusivo durante tres horas. Tras la retirada de los apósitos y limpieza de la zona con solución salina, se realizaba una exposición de 8 minutos a luz roja con una lámpara LED a 37J/cm² (Aktilite; Photocure, Oslo, Noruega) situada perpendicularmente a la piel a una distancia de entre 5 y 8cm. El dolor durante el tratamiento se aliviaba con la emisión de aire frío desde la fuente que posee la propia lámpara.

Tras el tratamiento, se instruía a los pacientes para calmar la irritación cutánea, la eventual exudación y el prurito posteriores con la aplicación de una solución antiséptica a base de sulfatos de zinc, aluminio potásico y cobre (Septomida spray; Viñas, Barcelona, España), y para protegerse del sol evitando salir en los primeros dos días, y en adelante mediante la aplicación del fotoprotector antes mencionado media hora antes de exponerse al aire libre. Además, se les indicó que evitaran cualquier cuidado cosmético en la zona a tratar a excepción de crema hidratante sin activos antienvjecimiento.

C.4. Evaluación de respuesta clínica

La respuesta al tratamiento fue valorada mediante fotografías digitales del área a tratar antes del tratamiento y en la visita de seguimiento a las seis semanas del mismo. El grado de respuesta fue determinado por dos dermatólogos independientes en dos términos: la **disminución en el número de QA** en el área tratada, y la **respuesta clínica global** en tres categorías: respuesta completa, definida por una mejoría del 75% al 100% en estos términos (fig. 17), respuesta

parcial ante cualquier mejoría intermedia (fig. 18), y ausencia de respuesta (ver definiciones de variables más adelante).



Fig. 17: Respuesta clínica completa (izda. basal y dcha. tras TFD)



Fig. 18: Respuesta clínica parcial (izda. basal y dcha. tras TFD)

C.5. Estudio histológico e inmunohistoquímico

C.5.1. Obtención de biopsias

En el momento del reclutamiento, se realizó una biopsia en sacabocados de 3mm de la QA índice, siendo ésta la lesión con mayor grado de Olsen y de un diámetro suficiente para permitir dos biopsias de 3mm. En la visita de seguimiento a las 6 semanas, se realizó una segunda biopsia en un área contigua a la cicatriz de la primera biopsia (fig. 19). Las muestras fueron fijadas en formalina al 10% y procesadas por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario del Henares, siendo preparadas en parafina y talladas en cortes de 3µm.



Fig. 19: Una misma QA biopsiada (flecha) en la visita basal (izda.) y en la visita post-tratamiento (flecha) a la derecha.

C.5.2. Evaluación histológica e inmunohistoquímica

Las tinciones con hematoxilina-eosina para el examen histológico fueron realizadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Henares, así como la inmunotinción con CD1a. Las tinciones para los inmunomarcadores p53, ki67, aurora B kinasa, survivina, VDR y β -catenina fueron realizadas en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid.

	Anticuerpo	Origen	Casa comercial
1º	VDR	Conejo	Cell Signaling
	β-catenina	Ratón	BD Transduction laboratories TM
	Ki67	Conejo	Cell Signaling
	P53	Ratón	Cell Signaling
	Aurora B	Conejo	Cell Signaling
	Survivina	Conejo	Abcam [®]
2º	HRP, Rabbit		Cell Signaling
	HRP, Mouse		Cell Signaling

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el estudio. Se especifica el anticuerpo, su origen y la casa comercial.

La caracterización de las QA se realizó utilizando los anticuerpos indicados en la tabla 5. Las secciones fueron desparafinadas sumergiéndolas en xilol y pasándolas por series decrecientes de alcohol. Se procedió a inhibir la peroxidasa endógena durante 10 minutos con 3% de metanol. Posteriormente se realizó un lavado en H₂O durante 20 min. Seguidamente las muestras se incubaron en buffer citrato pH 6.0 (*Antigen unmasking solution*, Vector, H-3300) durante 15 minutos en olla a presión para el desenmascaramiento del antígeno, se dejaron enfriar durante 30 minutos y se lavaron en PBS durante 5 minutos. La unión inespecífica del anticuerpo se bloqueó con *protein block* (Dako, X0909) durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron incubados en cámara húmeda durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS durante 20 min. Para la detección del anticuerpo primario se usaron los anticuerpos secundarios, ya conjugados con la peroxidasa durante 30 minutos, y diaminobenzidina (Vector, SK-4105) como cromógeno. Finalmente, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, lavadas en agua del grifo, deshidratadas y montadas en definitivo en DePex (Serva).

La valoración histológica e inmunohistoquímica fue llevada a cabo de forma independiente por dos patólogos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda. La displasia queratinocítica en las lesiones fue clasificada, según la definición de Yantsos y cols. en 3 grados KIN (atipia leve, moderada, grave) (26). Los marcadores nucleares β -catenina, p53, Ki67, Aurora B, Survivina, y VDR se valoraron estimando el porcentaje de

expresión en las células tumorales. En el caso de VDR, además, se valoró la intensidad de la expresión nuclear en los siguientes grados (0: ausencia de tinción, 1+: expresión leve, 2+: expresión moderada; 3+: expresión intensa). La expresión de membrana de la β -catenina fue del 100% en todos los casos, como es propio en lesiones intraepiteliales, por lo que no se tuvo en cuenta la expresión en membrana, y se valoró solamente el porcentaje de células con expresión nuclear. En cuanto al marcador de células de Langerhans CD1a, se valoró en 3 secciones distintas como recomienda la literatura.

C.6. Determinaciones séricas

Todas las determinaciones se realizaron en el Laboratorio Clínico Central de Madrid, al que se envían para estudio las muestras de sangre extraídas en el Hospital Universitario del Henares.

C.6.1. Niveles de vitamina D, calcio y PTH en sangre

- *Calcio*: Enzimoinmunoensayo fotométrico de Beckman. Método Arsenazo. Resultado en mg/dl.
- *25-hidroxi Vitamina D*: Electroquimioluminiscencia de Roche. En ng/ml. Además la variable vitamina D también se utiliza en forma de variable cualitativa estratificada como: suficiente (≤ 20 ng/ml), insuficiente (20-30 ng/ml) y suficiente (>30 ng/ml).
- *PTH intacta*: Quimioluminiscencia de Siemens. En pg/ml.

C.6.1. Niveles de lípidos

En el plasma total se determinó colesterol total, triglicéridos (basados en los métodos enzimáticos: CHOD-PAP y GPO-PAP, respectivamente) y colesterol unido a HDL (determinado por método directo), todo ello en un equipo AU5400 de Beckman Coulter, Inc.

El ensayo de la determinación directa de colesterol HDL se basa en la precipitación de las partículas unidas a apo B100, y consta de dos fases:

- a. El colesterol contenido en todas las lipoproteínas distintas de las de alta densidad (HDL) se solubiliza y es consumido por la colesterol oxidasa, peroxidasa y *N,N*-bis(4-sulfobutil)-*m*-toluidina disódico (DSBmT), para generar un producto incoloro.
- b. En la segunda fase, un detergente selectivo solubiliza las lipoproteínas HDL. El colesterol unido a las lipoproteínas HDL se libera para reaccionar con la enzima colesterol estearasa, la colesterol oxidasa, y un sistema cromógeno que produce un complejo de color azul, que puede ser medido colorimétricamente.

C.7. Estudio de polimorfismos genéticos

En cada paciente se realizó una extracción de sangre en la visita basal que se conservó a -80°C hasta su procesamiento para estudio de los polimorfismos de los genes de la vía de la VD. El análisis fue realizado en los laboratorios de N.I.M. Genetics en Cantoblanco, Madrid.

C.7.1. Extracción del ADN de muestras de sangre

Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se procedió a extraer el ADN de cada una de ellas de manera automatizada con el sistema Maxwell RSC (Promega). El proceso se realiza dentro de una campana de PCR. Al pellet de células se le añadió 1 mL de agua libre de nucleasas, se agitó en el vórtex para resuspender el pellet y se volvió a centrifugar a máxima revolución durante 2 min. Se retiró el sobrenadante que se procesó de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante: se añadió todo el volumen de la posición 8 del cartucho del sistema Maxwell, se resuspendió de nuevo hasta quedar completamente homogéneo; se añadió todo el volumen del tubo a la misma posición del cartucho. Una vez conectado el Maxwell a un sistema informático, se seleccionó en el software el protocolo de RSC Cultured Cells AS1620, y se midió la concentración en Nanodrop con 1,5 μ L de ADN en el lector de espectrofotometría. La concentración óptima para el Genotipado con SNPTYPE tiene que ser ≥ 25 ng/ μ L. Una vez extraído el ADN se procedió a su genotipado.

C.7.2. Genotipado

El genotipado de SNPs de vitamina D se realizó mediante SNPTYPE (química basada en la detección del polimorfismo de nucleótido único mediante una PCR específica de alelo) en placas de circuitos de fluidos integrados o IFCs usando el sistema Juno para el genotipado y el lector EP1 para el análisis posterior. Los primers utilizados fueron SNPTYPE assays, comprendidos por un allele specific-primer y un locus-specific primer para cada SNP. Para el proceso se utilizó el kit de Fluidigm y se utilizaron placas desechables de PCR. Los SNPs estudiados están listados en la tabla 6.

ID Fluidigm	SNP	Gen	Alelo X	Alelo Y
GTA0071276	rs10741657	CYP2R1	A	G
GTA0149161	rs11023380	CYP2R1	A	G
GTA0127015	rs11568820	VDR	A	G
GTA0071258	rs1544410	VDR	A	G
GTA0172287	rs2282679	GC (VDBP)	A	C
GTA0080448	rs3736228	LRP5	C	T
GTA0149170	rs3829251	DHCR7/NADSYN1	A	G
GTA0105721	rs4944957	DHCR7/NADSYN1	A	G
GTA0071268	rs7041	GC (VDBP)	G	T
GTA0068599	rs731236	VDR	C	T
GTA0181183	rs7968585	VDR	C	T
GTA0105066	rs7975232	VDR	A	C

Tabla 6: Detalle de los SNPs estudiados

C.7.3. Análisis

Una vez finalizó el protocolo en Juno se encendió el lector EP1 y se introdujo la placa en el mismo y se utilizó el software de análisis bioinformático Fluidigm SNP Genotyping Analysis.

C.8. Variables del estudio

Todas las variables fueron recogidas de forma prospectiva en un cuaderno de recogida de datos, con los valores predefinidos según como se expone a continuación:

Variables independientes

Variables sociodemográficas

- **Edad**: variable cuantitativa continua, definida como la edad del paciente en el momento de la inclusión (años)
- **Sexo**: variable cualitativa dicotómica (hombre o mujer)
- **Fototipo**: variable cualitativa nominal, con valores del I al VI según las definiciones de Fitzpatrick (J Med Aesth 1975 (168)) basadas en el color de piel, pelo, ojos y forma de respuesta a la exposición solar.
- **Índice de masa corporal**: variable cuantitativa continua calculada como cociente entre el peso y el cuadrado de la estatura (kg/m^2).

Variables clínicas

- **Tiempo en tto. con estatinas**: variable cuantitativa continua, definida como el tiempo transcurrido bajo tratamiento con una o varias estatinas hasta el momento de la inclusión (meses).
- **Tiempo en tto. con metformina**: variable cuantitativa continua, definida como el tiempo transcurrido bajo tratamiento con metformina hasta el momento de la inclusión (meses).
- **Tiempo en tto. con IECAs**: variable cuantitativa continua, definida como el tiempo transcurrido bajo tratamiento con un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina hasta el momento de la inclusión (meses).
- **Tiempo en tto. con hidroclorotiazida**: variable cuantitativa continua, definida como el tiempo transcurrido bajo tratamiento con hidroclorotiazida hasta el momento de la inclusión (meses).
- **Localización de las lesiones**: variable cualitativa, indicando la localización de las queratosis actínicas a tratar, categorizada dicotómicamente en “cara” o “cuerpo cabelludo”.

- **Número de lesiones**: variable cuantitativa continua, recogida en las visitas basal y post-tratamiento, que representa el número de QA presentes en la zona a tratar.
- **Grado clínico basal de la QA índice**: variable cualitativa ordinal, recogida en las visitas basal y post-tratamiento, definida por la gravedad de la QA a la exploración física según definición de Olsen (J Am Acad Dermatol 1991 (3)). Categorizada en grados 1 (leve, lesión visible no palpable), 2 (moderada, lesión palpable) y 3 (grave, claramente palpable, hiperqueratósica y con ulceración y/o sensibilidad al tacto).

Variables bioquímicas

- **Vitamina D (1,25-OH₂-D3) sérica**: variable cuantitativa continua recogida en las extracciones de sangre basal y post-tratamiento (ng/ml)
- **Colesterol total sérico**: variable cuantitativa continua recogida en las extracciones de sangre basal y post-tratamiento (mg/dl)
- **HDL sérica**: variable cuantitativa continua recogida en las extracciones de sangre basal y post-tratamiento (mg/dl)
- **LDL sérica**: variable cuantitativa continua recogida en las extracciones de sangre basal y post-tratamiento (mg/dl)
- **Triglicéridos séricos**: variable cuantitativa continua recogida en las extracciones de sangre basal y post-tratamiento (mg/dl)
- **PTH sérica basal**: variable cuantitativa continua (pg/ml) recogida en la extracción de sangre basal.

Variables histológicas e inmunohistoquímicas

- **Diagnóstico histológico de la QA índice**: variable cualitativa dicotómica, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, representando la confirmación histológica del diagnóstico de QA (categorías “QA” y “otro diagnóstico”).
- **Subtipo histológico de la QA índice basal**: variable cualitativa nominal, recogida en la biopsia basal como caracterización histológica diferencial dentro del diagnóstico de QA (categorías: clásica, hipertrófica, bowenoide, atrófica, acantolítica; ver definiciones en introducción).
- **Grado histológico (KIN) de la QA índice**: variable cualitativa ordinal, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, según la clasificación de Yantsos y cols. (26) en grados I (displasia contenida en el tercio inferior de la epidermis), II (dos tercios inferiores) y III (atipia en la totalidad del grosor de la epidermis).
- **Porcentaje de expresión celular de Ki67**: variable cuantitativa continua, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, representando el porcentaje medio de células epidérmicas positivas para anticuerpos anti-ki67 en los cortes valorados de cada QA.

- **Porcentaje de expresión celular de p53**: variable cuantitativa continua, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, representando el porcentaje medio de células epidérmicas positivas para anticuerpos anti-p53 en los cortes valorados de cada QA.
- **Porcentaje de expresión celular de VDR**: variable cuantitativa continua, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, representando el porcentaje medio de células epidérmicas positivas para anticuerpos anti-VDR en los cortes valorados de cada QA.
- **Intensidad de expresión celular de VDR**: variable cuantitativa discreta, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, definida visualmente en grados 1, 2 y 3 según la intensidad media de la tinción con anti-VDR en los cortes valorados de cada QA.
- **Número de células con expresión nuclear de β -catenina**: variable cuantitativa continua, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, que representa el número medio de células positivas para anticuerpos anti- β -catenina en los cortes valorados de cada QA.
- **Porcentaje de expresión celular de aurora B kinasa**: variable cuantitativa continua, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, representando el porcentaje medio de células epidérmicas positivas para anticuerpos anti-aurora B kinasa en los cortes valorados de cada QA.
- **Porcentaje de expresión celular de survivina**: variable cuantitativa continua, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, representando el porcentaje medio de células epidérmicas positivas para anticuerpos anti-survivina en los cortes valorados de cada QA.
- **Número de células con expresión de Cd1a**: variable cuantitativa continua, recogida en las biopsias basal y post-tratamiento, que representa el número medio de células positivas para anticuerpos anti-CD1a en los cortes valorados de cada QA.

Variables genéticas

Los 12 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) explorados en células sanguíneas se han analizado como variables cualitativas nominales resultando cada uno en 3 posibles genotipos.

- **Polimorfismos del gen del VDR**
 - **Rs11568820 (CDx-2)** : categorías “GG”, “AA” y “AG”
 - **Rs1544410 (Bsm I)** : categorías “GG”, “AA” y “AG”
 - **Rs797523 (Apa I)** categorías “AA”, “CC” y “AC”
 - **Rs731236 (Taq I)** : categorías “CC”, “TT” y “CT”
 - **Rs7968585**: categorías “CC”, “TT” y “CT”
- **Polimorfismos del gen GC (VDBP)**
 - **Rs2282679**: categorías “AA”, “CC” y “AC”
 - **Rs7041**: categorías “GG”, “TT” y “GT”
- **Polimorfismos del gen CYP2R1**

- **Rs10741657**: categorías “GG”, “AA” y “AG”
- **Rs11023380**: categorías “GG”, “AA” y “AG”
- **Polimorfismo Rs3736228 del gen LRP5**: categorías “CC”, “TT” y “CT”
- **Polimorfismos del gen DHCR7/NADSYN**
 - **Rs3829251**: categorías “GG”, “AA” y “AG”
 - **Rs4944957**: categorías “GG”, “AA” y “AG”

Variables dependientes

- **Respuesta clínica global**: variable cualitativa que considera en conjunto la reducción en el nº de QA y la disminución del grado clínico de las lesiones tras la TFD con MAL (dicotomizada en categorías “completa” ante mejoría igual o superior al 75% y “parcial” ante mejorías inferiores) (ver figuras 17 y 18).
- **Respuesta histológica**: variable cualitativa que considera la disminución de grado histológico KIN tras la TFD con MAL (dicotomizada en categorías “respuesta positiva” ante una reducción en la proporción de epidermis ocupada por la displasia, y “respuesta negativa” o falta de respuesta ante persistencia del mismo grado KIN).

C.9. Análisis estadístico

Estadística descriptiva

Se calculó la media y desviación estándar de aquellas variables cuantitativas, y la distribución de frecuencias de las variables cualitativas.

Estadística analítica

Se realizó el análisis univariante de las distintas variables independientes epidemiológicas, clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas, y de las variables dependientes respuesta clínica global y respuesta histológica. Se utilizó para ello la comparación de medias mediante pruebas no paramétricas dado el pequeño tamaño de la muestras: test de U de Mann-Whitey al comparar 2 medias y de Kruskal-Wallis cuando se compararon más de dos, o pruebas paramétricas, test t-Student si son 2 o test ANOVA de una vía si son más de dos, en función de si la variable tiene o no una distribución normal. Para el análisis de variables cualitativas se utilizó la prueba de chi-cuadrado, y el test t-Student si son 2 o test ANOVA de una vía si son más de dos, o test no paramétricos para aquellas variables que no siguen una distribución normal. Para la comprobación de la normalidad de la distribución de algunas variables cuantitativas se emplearon gráficos Q-Q plot y el test de Kolmogorov-Smirnov.

Se completó el análisis mediante varios modelos de regresión logística multivariante tomando como variable dependiente la mejoría global clínica y la mejoría histológica incluyendo comovariantes independientes aquellas que habían obtenido significación estadística en el análisis univariante. Se comprobó la bondad de ajuste de los modelos multivariantes a través del test de Hosmer y Lemeshow.

Se consideró que las diferencias son estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Para la realización de dicho análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 19.0 (IBM, Armonk, NY).

C.10. Tratamiento de la bibliografía

Las fuentes bibliográficas se obtuvieron de la base de datos Medline, a través de los motores *online* de búsqueda bibliográfica Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y Google Scholar (<https://scholar.google.es>).

La introducción de las citaciones bibliográficas en el texto se ha realizado mediante el programa gestor de referencias Zotero[®] (George Mason University, Fairfax, VA, E.E.U.U.), versión 4.0.29.15., seleccionando el estilo Vancouver de citación.

C.11. Aspectos éticos

A excepción del análisis genético, llevado a cabo en el laboratorio de N.I.M. Genetics en Madrid, el resto de procedimientos (toma de fotografías, visitas y procedimientos diagnósticos incluyendo biopsias y extracciones de sangre) fueron similares a los llevados a cabo en la práctica clínica habitual y no se realizaron de manera diferente por razón de la participación en el estudio. Las imágenes no permiten la identificación de los pacientes, y su clasificación se realizó de forma codificada. Los datos fueron tratados de manera confidencial.

El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda (acta nº 299) con fecha 12 de mayo de 2014 (anexo 1). Todos los pacientes seleccionados para el estudio fueron informados por escrito de las características del mismo y firmaron un documento de consentimiento informado antes de participar en el estudio (anexo 2), y un consentimiento informado adicional sobre la terapia fotodinámica, explicando las características especiales del tratamiento (anexo 3).

D. Resultados

D.1. Características de la muestra

Treinta y tres pacientes fueron inicialmente seleccionados para el estudio, de los cuales ocho quedaron excluidos. Los motivos fueron diagnóstico histológico incorrecto en tres casos, cumplimiento incorrecto del tratamiento en dos casos y pérdida de seguimiento o deseo expreso del paciente en tres casos. El grupo de pacientes tratados con TFD con MAL que completaron el estudio lo componen veinticinco individuos cuyas características están recogidas en la tabla 7.

Caso	Edad	Sexo	Fototipo	I.M.C	Localización	Medicación previa (>12 meses)
2	71	Varón	III	33,2	Cuero cab.	Simvastatina, metformina
3	70	Varón	III	25,8	Cuero cab.	No
4	69	Varón	III	28,3	Cuero cab.	Simvastatina, IECAs
7	81	Varón	II	25,3	Cuero cab.	Simvastatina, metformina, IECAs
9	65	Mujer	II	24,3	Cara	IECAs
11	71	Mujer	II	39,8	Cuero cab.	No
13	61	Varón	III	24,6	Cuero cab.	Simvastatina
14	80	Varón	II	30,9	Cara	Metformina, IECAs, tiazidas
15	67	Varón	III	30,5	Cuero cab.	Simvastatina, metformina, IECAs, tiazidas
18	80	Varón	III	31,6	Cuero cab.	Simvastatina, metformina, IECAs, tiazidas
19	69	Varón	II	33,9	Cuero cab.	IECAs
21	70	Varón	II	28,7	Cara	Simvastatina
22	61	Mujer	III	42,4	Cara	Simvastatina, metformina
23	76	Mujer	II	30,4	Cuero cab.	IECAs
24	71	Varón	III	29,2	Cara	No
25	81	Mujer	III	28,5	Cara	Metformina
28	70	Varón	III	27,1	Cara	Simvastatina
29	73	Varón	III	No regist.	Cuero cab.	Simvastatina, IECAs
32	70	Varón	II	33,0	Cuero cab.	No
35	61	Varón	III	30,8	Cuero cab.	Simvastatina, IECAs
36	65	Varón	II	23,3	Cuero cab.	Metformina
37	76	Varón	III	31,2	Cara	Simvastatina
38	77	Varón	III	37,9	Cuero cab.	Simvastatina, IECAs
41	73	Varón	III	29,9	Cara	Simvastatina
43	68	Varón	III	29,8	Cuero cab.	No

Tabla 7: Características clínicas de los pacientes tratados con MAL-TFD (no regist.= no registrado)

La distribución de cada variable clínica está recogida en la tabla 8. La edad media fue de 70,1 años (rango 61-81). 6 pacientes (24%) eran mujeres y 19 (76%), varones. 15 pacientes tenían un fototipo de Fitzpatrick III (60%) y 10 pacientes (40%) un fototipo II. El I.M.C. promedio fue de 30,1 kg/m² (rango 23,3-42,4). Las QA se localizaban en el cuero cabelludo en 16 pacientes (64%) y en la cara en 9 pacientes (36%). La historia médica de los pacientes incluía tratamiento, durante al menos 12 meses, con simvastatina en 14 casos (56%), metformina en 8 casos (32%), enalapril u otros IECAs en 11 casos (44%) e hidroclorotiazida en 3 casos (12%).

Característica		Núm. de pacientes	Media (rango)
Edad(años)			70,1 (61-81)
Sexo	Varones	19/25 (76%)	
	Mujeres	6/25 (24%)	
Fototipo	II	10/25 (40%)	
	III	15/25 (60%)	
I.M.C. (kg/m ²)			30,1 (23,3-42,4)
Localización de las QA tratadas	Cara	9/25 (36%)	
	Cuero cabelludo	16/25 (64%)	
Medicación previa (>12 meses)	Simvastatina	14/25 (56%)	
	Metformina	8/25 (32%)	
	IECAs	11/25 (44%)	
	Tiazidas	3/25 (12%)	

Tabla 8: Distribución de los pacientes de acuerdo a sus características clínicas

El tratamiento con MAL-TFD indujo una disminución significativa del número de QA por paciente (media +/- D.E.), de 7,84 (2,79) a 2,84 (1,60) QA. La respuesta clínica global fue completa en 6/25 pacientes (24%), parcial en 19/25 pacientes (76%), y no hubo casos de ausencia de respuesta (tabla 9) (figs. 20 y 21).

Caso	Número de QA basal/tras TFD	Grado clínico QA índice basal/tras TFD	Respuesta clínica global
2	12/5	3 / 1	Parcial
3	5/1	2 / 1	Parcial
4	7/3	3 / 0	Parcial
7	11/2	3 / 2	Parcial
9	7/4	2 / 1	Parcial
11	10/3	2 / 1	Parcial
13	6/1	2 / 0	Parcial
14	8/3	3 / 1	Parcial
15	12/3	3 / 1	Completa
18	8/7	2 / 1	Parcial
19	12/5	2 / 0	Parcial
21	7/2	2 / 0	Completa
22	9/4	2 / 0	Parcial
23	6/2	2 / 0	Parcial
24	5/2	3 / 1	Parcial
25	3/3	3 / 2	Parcial
28	5/2	3 / 1	Parcial
29	11/0	3 / 1	Completa
32	7/5	3 / 1	Completa
35	7/3	3 / 1	Parcial
36	5/0	2 / 0	Completa
37	7/3	2 / 0	Parcial
38	6/3	3 / 1	Parcial
41	5/3	3 / 1	Completa
43	5/3	2 / 1	Parcial

Tabla 9: Detalle de la respuesta al tratamiento según parámetros clínicos



Fig. 20: Respuesta clínica global completa en cuatro pacientes (izda. basal y dcha. tras TFD).



Fig. 21: Respuesta clínica global parcial en cuatro pacientes (izda. basal y dcha. tras TFD)

D.2. Hallazgos bioquímicos

Se analizó una muestra de sangre a los 25 pacientes antes del tratamiento de sus QA. Sus valores séricos basales (media +/- D.E.) fueron: 25-OH-VD 25,37 +/- 9,86 ng/ml, colesterol total 180,95 +/- 30,46 mg/dl, HDL 53,52 +/- 13,25 mg/dl, LDL 102,52 +/- 27,79 mg/dl y tcéridos 124,90 +/- 72,39 mg/dl (tabla 10).

Caso	25-OH-D basal (ng/ml)	Grado
2	48,1	Suficiencia
3	29,3	Suficiencia
4	30,6	Suficiencia
7	24,2	Insuficiencia
9	25,9	Insuficiencia
11	10,8	Deficiencia
13	25,3	Insuficiencia
14	25,7	Insuficiencia
15	27,2	Insuficiencia
18	24,6	Insuficiencia
19	11,6	Deficiencia
21	19,6	Deficiencia

22	10,9	Deficiencia
23	13,2	Deficiencia
24	21,7	Insuficiencia
25	20,6	Insuficiencia
28	25,1	Insuficiencia
29	16,9	Deficiencia
32	40,8	Suficiencia
35	21,9	Insuficiencia
36	23,2	Insuficiencia
37	30,8	Suficiencia
38	21,4	Insuficiencia
41	42,0	Suficiencia
43	42,3	Suficiencia

Tabla 10: Valor de VD basal (25-OH-D) de los pacientes y estatus de VD según las guías de la Endocrine Society (2011)

El nivel de VD de cada paciente se ha detallado en la tabla 9. Se halló niveles suficientes (>30ng/ml) en 7/25 pacientes (28%), insuficientes en 12/25 (48%) casos y deficientes (>20 ng/ml) en 6/25 (24%) pacientes.

D.3. Hallazgos histológicos

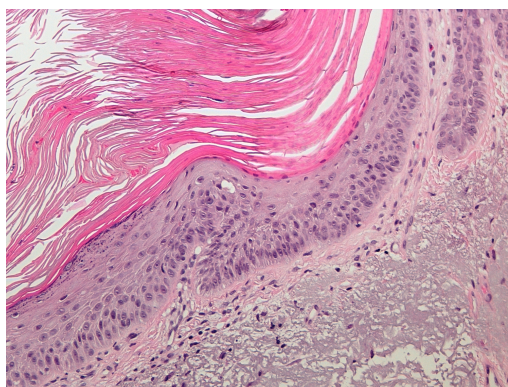
Las lesiones índice de los 25 pacientes mostraron en todo caso un grado variable de displasia queratinocítica, definida como pérdida de polaridad queratinocítica con aumento de la relación nucleo-citoplasma y paraqueratosis. Una de las biopsias pre-tratamiento mostró la presencia simultánea de una queratosis seborreica tangente al área displásica, y fue descartada de los análisis de datos histológicos.

Las características histológicas de los 24 casos restantes están recogidas en la tabla 11. El tipo histológico más frecuente fue el hipertrófico (9/24, 37,5%), seguido del bowenoide (7/24, 29,17%) y el subtipo clásico (7/24, 29,17%). La lesión restante fue diagnosticada de QA liquenoide (1/24, 4,16%). La gravedad de la displasia queratinocítica basal en las QA biopsiadas fue diagnosticada como KIN 3 en 7/24 (29,17%) QA, KIN 2 en 10/24 (41,66%) lesiones y KIN 1 en las restantes 7/24 (29,17%) QA (Fig.10).

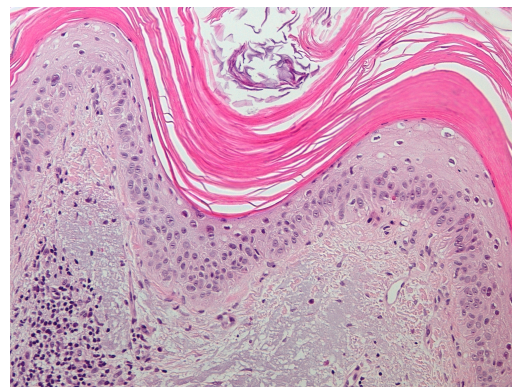
Caso	Subtipo histológico	Grado de displasia (KIN) basal/tras TFD	Respuesta histológica
2	Clásica	2 / 0	+
3	Bowenoide	3 / 2	+
4	Hipertrófica	2 / 0	+
7	Bowenoide	3 / 3	-
9	Bowenoide	3 / 0	+
11	Liquenoide	2 / 2	-
13	Clásica	1 / 0	+
14	Hipertrófica	2 / 1	+
15	Bowenoide	3 / 3	-
18	Hipertrófica	1 / 1	-
19	Clásica	1 / 1	-
21	Hipertrófica	2 / 0	+
22	Clásica	2 / 0	+
23	Hipertrófica	2 / 2	-
24	Bowenoide	3 / (cicatriz)	(no valorable)
25	Bowenoide	3 / 0	+
28	Hipertrófica	1 / 0	+
29	Bowenoide	3 / 0	+
32	Clásica	1 / 0	+
35	Hipertrófica	2 / 1	+
36	Clásica	1 / 0	+
37	Clásica	2 / 0	+
38	Hipertrófica	1 / 0	+
43	Hipertrófica	2 / 0	+

Tabla 11: Subtipo histológico y evolución de la displasia tras TFD. Respuesta histológica: *negativa equivale a ausencia de respuesta*, es decir, la persistencia de atipia citológica en el mismo grado KIN que antes del tratamiento, y *positiva a remisión completa de la atipia o al menos reducción del grado KIN*

Una de las QA índice fue biopsiada post-tratamiento, en el lugar de la cicatriz de la biopsia previa, y no se ha tenido en cuenta en los análisis sobre los cambios histológicos tras TFD. Hubo una respuesta histológica positiva en 17/23 casos (73,9%), que fue completa (ausencia de QA) en 3/6 (50%) de las QA grado KIN 3 (figs. 24 y 25), el 6/10 (60%) de las lesiones KIN 2 (fig.22) y 5/7 (71,4%) de las QA KIN 1 (fig. 21). Esta mejoría histológica de las QA tras TFD fue estadísticamente significativa ($p=0,000$) (tabla 12).

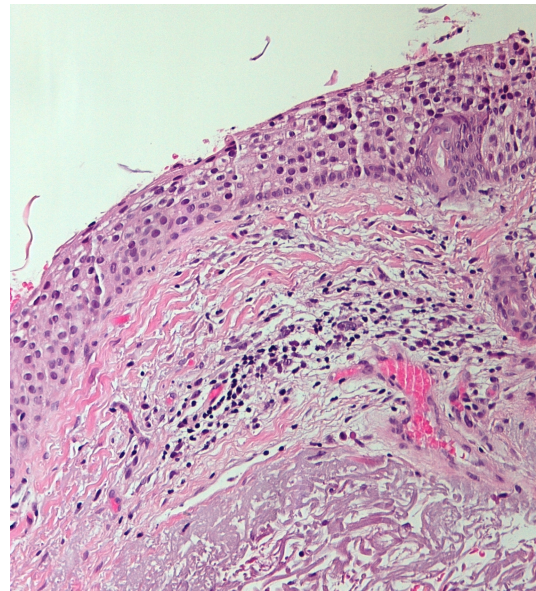
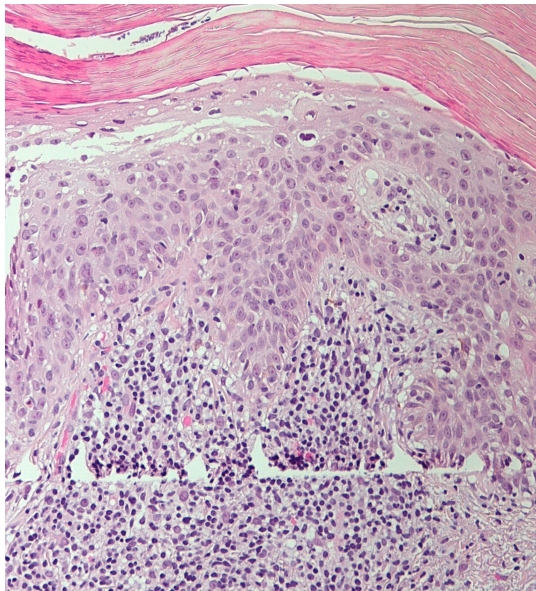


12



13

Figs. 22 y 23: Muestras pre-tratamiento de la QA índice en dos pacientes, clasificadas respectivamente como KIN I (12) y II (13) en función de la porción del grosor epidérmico que alcanza la atipia queratinocítica (hematoxilina-eosina)



Figs. 24 y 25 QA índice basales en dos pacientes, clasificadas respectivamente como KIN III (14) y KIN III bowenoide(15)

D.4. Hallazgos inmunohistoquímicos

Inmunomarcador N=23	Basal (media, D.E.)	Tras TFD (media, D.E.)	p
Grado histológico KIN	1,88 (0,85)	0,67 (1,01)	0,000
Expresión de VDR (%)	56,67 (20,36)	66,67 (22,00)	0,062
Intensidad VDR	1,96 (0,81)	2,08 (0,93)	0,479
Expresión β cat. nuclear (%)	4,17 (5,69)	2,61 (4,59)	0,191
Expresión de ki67 (%)	57,08 (27,10)	26,88 (19,27)	0,000
Expresión de p53 (%)	59,17 (27,72)	26,39 (24,54)	0,000
Expresión de survivina (%)	46,82 (24,23)	29,77 (18,48)	0,005
Expresión de aurora B (%)	37,00 (19,89)	19,00 (14,11)	0,000
Expresión de CD1a (n° céls.)	17,58 (10,00)	17,13 (7,64)	0,840

Tabla 12: Evolución del grado histológico y la expresión de los distintos inmunomarcadores tras TFD

Los porcentajes promedio de inmunotinción con anticuerpos dirigidos contra VDR, β -catenina, Ki67, p53, aurora B, survivina y CD1a en secciones de las QA índice basalmente y tras TFD están listados en la tabla 12 e ilustrados en las figs. 26 a 29. Se observó un descenso significativo de la expresión de ki67 (basal 57,08% (DE 27,10), post-tratamiento 26,88% (DE 19,27), $p=0,000$), p53 (basal 59,17% (DE 27,72), post-tratamiento 26,39% (DE 24,54), $p=0,000$), aurora B (basal 37,00% (DE 19,89), post-tratamiento 19,00% (DE 14,11), $p=0,000$) y survivina (basal 46,82% (DE 24,23), post-tratamiento 29,77% (DE 18,48), $p=0,005$) (fig.19).

El número de células con inmunomarcaje positivo para Cd1a no mostró cambios significativos tras TFD (basal 17,58 (DE 10,00), post-tratamiento 17,13 (DE 7,64), $p=0,840$) (fig.17), ni se observaron diferencias en el porcentaje de expresión de β -catenina nuclear (basal 4,17% (DE 5,69), post-tratamiento 2,61% (DE 4,59), $p=0,191$) (fig.18).

En cuanto a VDR, se observó una tendencia a su aumento de expresión tras TFD que no alcanza significación estadística (basal 56,67% (DE 20,36), post-tratamiento 66,67% (DE 22,00), $p=0,062$) (fig.16). Igualmente se investigó el posible efecto de TFD sobre la intensidad de tinción con VDR, sin hallar diferencias significativas (basal 1,96 (DE 0,81), post-tratamiento 2,08 (DE 0,93), $p=0,479$). (tabla 12).

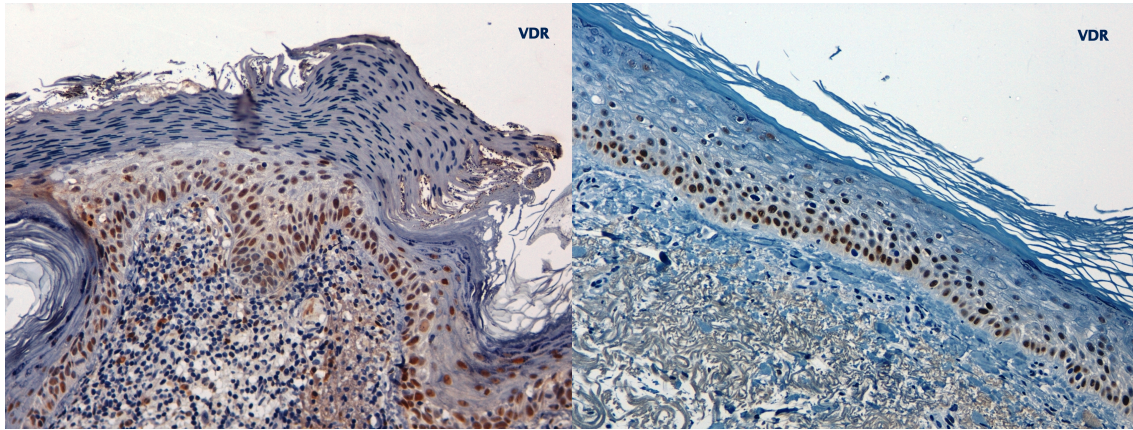


Fig. 26: Inmunomarcaje con VDR de una QA antes (izda.) y después (dcha.) de TFD.

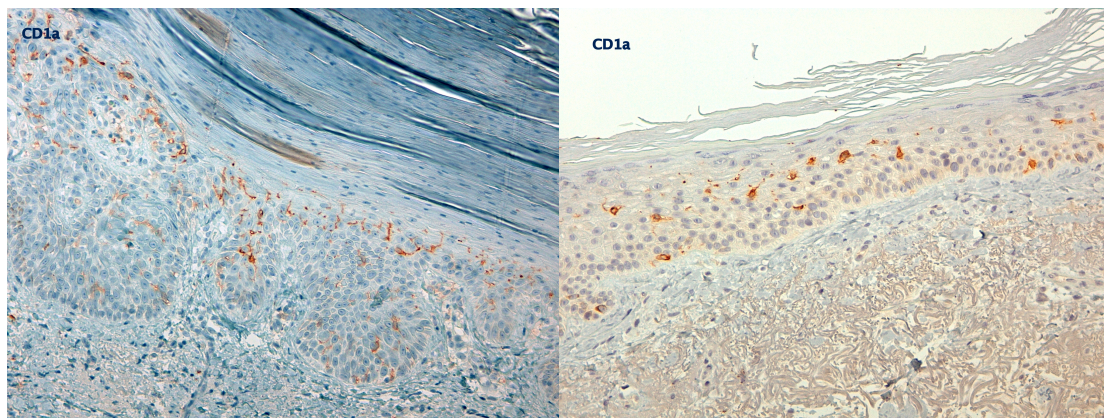


Fig. 27: Inmunomarcaje de células de Langerhans epidérmicas con CD1a en una QA antes (izda.) y después (dcha.) de TFD.

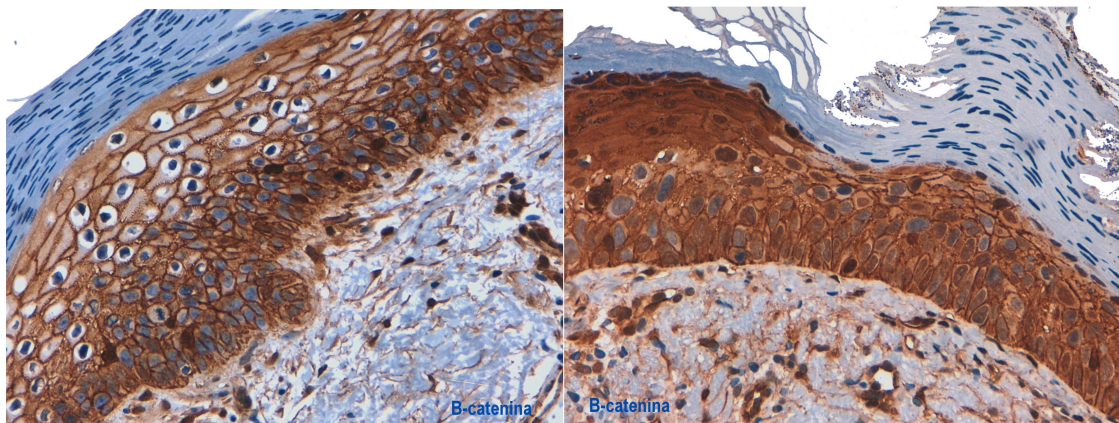


Fig. 28: Expresión nuclear de β -catenina en una QA antes (izda.) y después de TFD (dcha.)

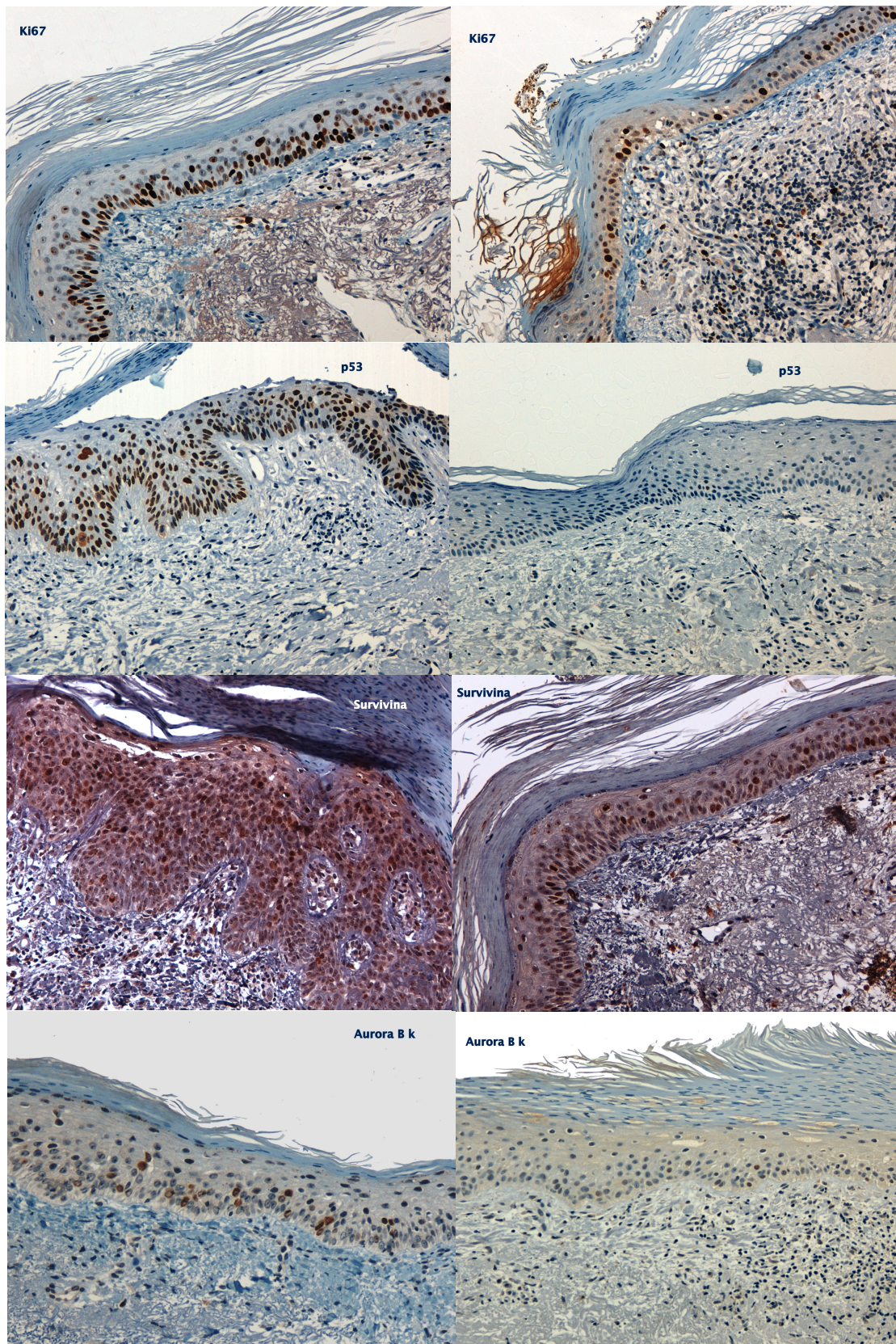


Fig. 29: Inmunomarcaje en parejas de muestras de QA antes (izda.) y después (dcha.) de tratamiento con TFD: p53 basal y tras tratamiento, Ki67 basal y tras tratamiento, aurora B kinasa y survivina. En todas las parejas de imágenes se aprecia un descenso de la expresión de cada inmunomarcador tras tratamiento.

D.5. Hallazgos genéticos

Todos los SNPs analizados presentaron una frecuencia de genotipos similar a la observada en la población ibérica, salvo en los casos de rs2282679 y rs797523. Se descartaron errores de genotipado comprobando que todos los polimorfismos se hallan en equilibrio Hardy-Weinberg. La distribución de los genotipos para los polimorfismos estudiados se resume en la tabla 13.

SNP	Gen	GG		AG		AA		AC		CC		CT		TT		GT		Total	
N=25		Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs.	Rel.
rs10741657	CYP2R1	6	24%	16	64%	3	12%											25	100%
rs11023380	CYP2R1	8	32%	10	40%	7	28%											25	100%
rs11568820 (CDx-2)	VDR	17	68%	6	24%	2	8%											25	100%
rs1544410 (BsmI)	VDR	8	32%	14	56%	3	12%											25	100%
rs3829251	NADSYN1	16	64%	6	24%	3	12%											25	100%
rs4944957	DHCR7	14	56%	5	20%	6	24%											25	100%
rs2282679	GC (VDBP)					23	92%	2	8%									25	100%
rs797523 (ApaI)	VDR					6	24%	13	52%	6	24%							25	100%
rs3736228	LRP5									20	80%	4	16%	1	4%			25	100%
rs731236 (TaqI)	VDR									3	12%	14	56%	8	32%			25	100%
rs7968585	VDR									9	36%	10	40%	6	24%			25	100%
rs7041	GC (VDBP)	10	40%											4	16%	11	44%	25	100%

Tabla 13: Frecuencia de genotipos para cada polimorfismo estudiado en valores absolutos (abs.) y relativos (rel.).

D.6. Asociación de las variables estudiadas con la respuesta al tratamiento

D.6.a Influencia de las variables clínicas

La respuesta clínica global no se halló significativamente asociada a las variables clínicas edad, sexo, fototipo, I.M.C. ni localización de las QA tratadas. Tampoco se halló asociación estadísticamente significativa de esta variable con el antecedente de tratamiento con simvastatina, metformina, IECAs o hidroclorotiazida ni con el tiempo bajo cada uno de dichos tratamientos (tabla 14).

Considerando la disminución en el número medio de QA por paciente tras MAL-TFD, y su correlación con cada una de las variables clínicas cuantitativas (test de Pearson), se encontraron correlaciones positivas de este parámetro con el número de meses bajo tratamiento con simvastatina ($r=0.447$, $p=0.025$), IECAs ($r=0.41$, $p=0.042$) y metformina ($r=0.387$, $p=0.050$).

Características clínicas N=25	Respuesta clínica global		p
	Respuesta parcial n=6	Respuesta completa n=19	
Edad (media, D.E.)	71,47 (6,66)	69,67 (3,2)	0,53
Sexo			1,000
-Masculino	14 (73,37%)	5 (26,3%)	
-Femenino	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
Fototipo			0,175
-II	6 (60,0%)	4 (40,0%)	
-III	13 (86,7%)	2 (13,3%)	
I.M.C. (media, D.E.)	31.30 (5.13)	30.87 (5.71)	0.63
Localización			1,000
-Cara	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
-Cuero cabelludo	12 (75%)	4 (25%)	
Tratamiento previo con:			
-Simvastatina	11 (78,6%)	3 (21,4%)	1,000
-Metformina	6 (75,0%)	2 (25%)	1,000
-IECAs	9 (81,8%)	2 (18,2%)	0,661
-Tiazidas	2 (66,7%)	1 (33,3%)	1,000
Tiempo bajo tratamiento (meses) (media, D.E.)			
-Simvastatina	23,32 (31,52)	48,0 (40,87)	0,221
-Metformina	19,89 (39,09)	30,0 (46,63)	0,877
-IECAs	30,95 (44,78)	17,50 (38,63)	0,514
-Tiazidas	8,21 (28,30)	16,0 (39,19)	0,828

Tabla 14: Influencia de las variables clínicas en la respuesta clínica global de las QA a MAL-PDT

D.6.b Influencia de las variables bioquímicas

No se halló asociación estadísticamente significativa entre la respuesta clínica global y los niveles séricos de vitamina D, colesterol total, LDL o triglicéridos. Sin embargo, bajos niveles de HDL se asociaron significativamente con una respuesta clínica completa (42,00mg/dl (DE 6,23), $p=0,002$) (tabla 15).

Valores séricos basales N=25	Media (D.E.)	Respuesta clínica global		p
		Respuesta parcial (media, D.E.) n=19	Respuesta completa (media, D.E.) n=6	
Vitamina D (ng/ml)	25,37 (9,86)	24,42 (9,67)	27,67 (9,86)	0,483
Colesterol (mg/dl)	180,95 (30,46)	177,39 (30,75)	181,33 (29,36)	0,786
HDL (mg/dl)	53,52 (13,25)	56,22 (12,49)	42,00 (6,23)	0,002
LDL (mg/dl)	102,52 (27,79)	100,83 (27,32)	103,83 (26,10)	0,816
Trigliceridos (mg/dl)	124,90 (72,39)	101,94 (25,39)	178,17 (120,81)	0,184

Tabla 15: Influencia de las variables bioquímicas en la respuesta clínica global de las QA a MAL-TFD

Se observó que los pacientes con ausencia de respuesta histológica a TFD (reducción del grado de displasia) presentaban niveles inferiores de VD sérica. Así, el valor promedio en no respondedores se encontraba en rango de *deficiencia de VD* (18,60 ng/ml (DE 7,49), $p=0,050$). Además, los pacientes sin respuesta histológica presentaron niveles bajos de LDL (78,33mg/dl (DE 22,62), $p=0,017$) (tabla 16).

Valores séricos basales N=24	Respuesta histológica		p
	Respuesta positiva (media, D.E.) n=16	Ausencia de respuesta (media, D.E.) n=6	
Vitamina D (ng/ml)	26,96 (9,49)	18,60 (7,49)	0,050
Colesterol (mg/dl)	184,88 (29,03)	160,17 (32,00)	0,099
HDL (mg/dl)	52,19 (13,17)	55,50 (14,48)	0,614
LDL (mg/dl)	108,50 (24,69)	78,33 (22,62)	0,017
Triglicéridos (mg/dl)	121,38 (73,42)	132,00 (71,18)	0,764

Tabla 16: Influencia de las variables bioquímicas en la respuesta histológica de las QA a MAL-TFD

D.6.c Influencia de las variables histológicas e inmunohistoquímicas

El análisis de la posible asociación entre el grado histológico basal de la QA índice y la respuesta histológica al tratamiento, mostró una mejor respuesta para las QA grado KIN II, seguido de la KIN I y una peor respuesta en lesiones KIN III, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,409$). La relación entre el subtipo histológico de la QA índice y la respuesta histológica mostró que las variedades histológicas con mejor respuesta en la muestra fueron la clásica y la hipertrófica, aunque la comparación se ve limitada por la escasez de casos, no hallándose una relación estadísticamente significativa ($p=0,312$). Ambos resultados están detallados en la tabla 17.

Subtipo histológico N=23	Respuesta histológica		p (χ^2 Pearson)
	Respuesta positiva n=19	Ausencia de respuesta n=6	
KIN I	5 (71,43%)	2 (28,57%)	0,409
KIN II	8 (80,00%)	2 (20,00%)	
KIN III	4 (66,66%)	2 (33,34%)	
QA clásica 7/23	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0,312
QA hipertrófica 9/23	7 (77,8%)	2 (12,2%)	
QA liquenoide 1/23	0 (0%)	1 (100%)	
QA bowenoide 6/23	4 (66,7%)	2 (33,3%)	

Tabla 17: Influencia de los marcadores histológicos de la QA índice grado de displasia (KIN) y subtipo histológico en la respuesta histológica al tratamiento con TFD.

Se estudió la posible relación de la expresión de todos los inmunomarcadores en la QA índice antes de tratamiento con la respuesta clínica global y con la respuesta histológica. Se halló una asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de expresión de VDR y la respuesta clínica global, por la que valores más bajos de VDR en la QA basal se asocian a una respuesta completa ($p=0,002$). La intensidad de tinción de VDR y la expresión del resto de inmunomarcadores no mostraron hallarse significativamente asociados a la efectividad clínica (tabla 18).

Inmunomarcador N=23	Respuesta clínica global		p
	Respuesta parcial (media, D.E.) n=19	Respuesta completa (media, D.E.) n=6	
Expresión de VDR (%)	62,78 (16,74)	35,71 (19,88)	0,002
Intensidad de VDR	2,00 (0,77)	1,71 (0,95)	0,442
Expresión β cat. nuclear (%)	4,39 (5,62)	3,86 (5,40)	0,832
Expresión de ki67 (%)	56,39 (28,12)	51,00 (32,20)	0,683
Expresión de p53 (%)	64,41 (23,51)	59,00 (38,79)	0,701
Expresión de survivina (%)	47,35 (24,76)	40,00 (23,27)	0,509
Expresión de aurora B (%)	34,44 (19,62)	36,43 (22,31)	0,829
Expresión de CD1a (n° céls.)	19,28 (10,47)	12,29 (6,21)	0,114

Tabla 18: Influencia de la expresión de los distintos inmunomarcadores estudiados sobre la respuesta clínica global a TFD

En cuanto a la respuesta histológica, el único marcador que se halló asociado de forma estadísticamente significativa fue la expresión de aurora B. Así, los pacientes con una expresión mayor de este marcador mostraron una respuesta positiva (39,12 %, DE 19,94) frente a los que respondieron (19,17% (DE 13,93), $p=0,035$). El resto de inmunomarcadores no se hallaron significativamente asociados a respuesta histológica (tabla 19).

Inmunomarcador N=23	Respuesta histológica		p
	Respuesta positiva (media, D.E.) n=16	Ausencia de respuesta (media, D.E.) n=6	
Grado histológico KIN	1,94 (0,75)	1,71 (1,11)	0,564
Expresión de VDR (%)	59,41 (18,53)	53,33 (25,03)	0,535
Intensidad de VDR	2,00 (0,79)	1,83 (0,98)	0,680
Expresión β cat. nuclear (%)	5,53 (6,06)	1,17 (2,04)	0,103
Expresión de ki67 (%)	55,00 (29,42)	59,17 (22,00)	0,756
Expresión de p53 (%)	64,69 (27,35)	52,00 (22,80)	0,361
Expresión de survivina (%)	48,75 (23,70)	26,67 (23,38)	0,298
Expresión de aurora B (%)	39,12 (19,94)	19,17 (13,93)	0,035
Expresión de CD1a (n° céls.)	15,94 (7,83)	17,67 (10,21)	0,672

Tabla 19: Influencia de la expresión de los distintos inmunomarcadores estudiados sobre la respuesta a TFD a nivel histológico

D.6.d Influencia de los polimorfismos del gen del VDR y genes relacionados

Se halló una asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos de VDR BsmI ($p=0,05$) y TaqI ($p=0,05$) con la respuesta clínica global a TFD (tabla 20), siendo inferior la respuesta en genotipos heterocigotos de ambos SNPs. El resto de polimorfismos estudiados no mostraron asociación con la respuesta clínica. El polimorfismo re10741657 del gen VYP2R1 de la 25-hidroxilasa mostró una asociación significativa con la respuesta histológica, siendo inferior la respuesta a TFD en genotipo heterocigoto de este SNP. No se halló asociación de este parámetro de respuesta con el resto de SNPs estudiados (tabla 21).

SNP	Gen	Respuesta clínica global		p
		Parcial n=19	Completa n=6	
CDx-2	VDR	AG 4 AA 1 GG 14	AG 2 AA 1 GG 3	0,496
BsmI	VDR	AG 13 AA 1 GG 5	AG 1 AA 2 GG 3	0,050
TaqI	VDR	CT 13 CC 1 TT 5	CT 1 CC 2 TT 3	0,050
rs7968585	VDR	CT 9 CC 6 TT 4	CT 1 CC 3 TT 2	0,408
ApaI	VDR	AC 10 AA 4 CC 5	AC 3 AA 2 CC 1	0,791
rs7041	GC (VDBP)	GT 8 GG 8 TT 3	GT 3 GG 2 GG 1	0,926

rs3829251	NADSYN /DHCR7	AG 5 AA 3 GG 11	AG 1 AA 0 GG 5	0,453
rs4944957	NADSYN /DHCR7	AG 4 AA 6 GG 9	AG 1 AA 0 GG 5	0,224
rs2282679	GC (VDBP)	AC 2 AA 17 CC 0	AC 0 AA 6 CC 0	0,407
rs3736228	LRP5	CT 4 CC 14 TT 1	CT 0 CC 6 TT 0	0,373
rs10741657	CYP2R1	AG 10 AA 3 GG 6	AG 6 AA 0 GG 0	0,109
rs11023380	CYP2R1	AG 7 AA 5 GG 7	AG 3 AA 2 GG 1	0,651

Tabla 20: Asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la respuesta clínica global de las QA a TFD

SNP	Gen	Respuesta histológica		p
		Positiva n=17	Ausencia de respuesta n=7	
CDx-2	VDR	AG 3 AA 2 GG 12	AG 3 AA 0 GG 4	0,330
BsmI	VDR	AG 10 AA 2 GG 5	AG 4 AA 1 GG 2	0,986
TaqI	VDR	CT 10 CC 2 TT 5	CT 4 CC 1 TT 2	0,986
rs7968585	VDR	CT 7 CC 6 TT 4	CT 3 CC 2 TT 2	0,941
ApaI	VDR	AC 10 AA 4 CC 3	AC 3 AA 2 CC 2	0,753
rs7041	GC (VDBP)	GT 6 GG 9 TT 2	GT 5 GG 1 GG 1	0,200

rs3829251	NADSYN /DHCR7	AG 3 AA 2 GG 12	AG 3 AA 0 GG 4	0,330
rs4944957	NADSYN /DHCR7	AG 3 AA 4 GG 10	AG 2 AA 1 GG 4	0,783
rs2282679	GC (VDBP)	AC 1 AA 16 CC 0	AC 0 AA 7 CC 0	0,512
rs3736228	LRP5	CT 2 CC 14 TT 1	CT 1 CC 6 TT 0	0,801
rs10741657	CYP2R1	AG 12 AA 2 GG 3	AG 4 AA 1 GG 2	0,801
rs11023380	CYP2R1	AG 10 AA 4 GG 3	AG 0 AA 3 GG 4	0,025

Tabla 21: Asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la respuesta histológica a TFD

D.7. Análisis multivariante

Con el fin de estudiar las variables predictoras de la mejoría clínica global o histológica con las variables estudiadas, se realizaron sendos análisis de regresión logística múltiple.

Modelo de regresión 1

En el primer modelo se consideró la mejoría clínica global (superior del 75%) (dicotómica si/no) como variable respuesta y como variables explicativas aquellas que resultaron

significativas en las pruebas de asociación univariante (HDL, VDR, y los SNPs TaqI y ApaI del gen del VDR). Se utilizó el método de Introducción. Sólo el VDR queda en el modelo, de forma que la probabilidad de que un individuo con un VDR “x” logre la curación global con respecto a otro que tenga una unidad menos es 0,9 veces más (IC95% 0,867 a 0,986), con una R² de Nagelkerke de 0,444 (Prueba de Hosmer y Lemeshow p=0,632) (tabla 22).

	B	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
				Inferior	Superior
Expresión basal de VDR	0,078	0,016	0,925	0,867	0,986
Constante	2,954	0,065	19,190		

Tabla 22: Asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la respuesta histológica a TFD

Modelo de regresión 2

En el segundo modelo se consideró como variable dependiente la mejoría histológica (alguna mejoría frente a ninguna respuesta) y como variables independientes o predictoras el inmunomarcaje con Aurora B, los niveles séricos de vitamina D, los niveles séricos de LDL y el polimorfismo RS 11023380 del gen CYP2R1. Sólo el nivel sérico de LDL se queda en el modelo, de forma que un individuo que tenga un nivel de LDL x respecto a otro que tenga una unidad inferior tiene una probabilidad 1,082 (IC 95% .1,003 - 1,166) veces más de presentar mejoría histológica, con una R² de Nagelkerke de 0,467 (Prueba de Hosmer y Lemeshow p=0,706) (tabla 23).

	B	Sig.	Exp(B)	95% C.I. para EXP(B)	
				Inferior	Superior
LDL sérico	0,079	0,041	1,082	1,003	1,166
Constante	-5,904	0,076	0,003		

Tabla 23: Asociación entre los diferentes polimorfismos estudiados y la respuesta histológica a TFD

E. Discusión

La QA representa un espectro en el continuo hacia el desarrollo del carcinoma espinocelular invasivo, y siendo abordable mediante diversas terapias de fácil aplicación (e incluso autoaplicadas por el paciente en el caso de los medicamentos tópicos para las QA), esta preneoplasia (o neoplasia intraepitelial) constituye el principal factor de riesgo sobre el que se puede realizar una intervención para la prevención del CEC. Desde la descripción en 1953 del concepto de campo de cancerización(39), se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre las alteraciones histológicas y moleculares que se presentan en la displasia epidérmica clínica y subclínica(28)(169), y se reivindica la importancia del tratamiento del campo tanto como de las QA(170).

En este contexto, juegan un papel fundamental los tratamientos para la QA llamados “de campo”, que son capaces de actuar sobre cada lesión displásica focal, y al tiempo, contribuir a la normalización de la epidermis fotodañada circundante. Entre ellos la TFD destaca, en parte por sus características prácticas: efectividad de una sesión vs. aplicación repetida en el tiempo de un medicamento tópico, tratamiento de superficies extensas, cumplimiento al ser administrado por el dermatólogo, mayor eficacia que tratamientos tópicos autoadministrados(171)) y sobre todo destaca por su capacidad de reparar las alteraciones histológicas y moleculares marcadoras de carcinogénesis cutánea.

A pesar de su eficacia, que ronda un aclaramiento de QA leves y moderadas de entre 86 y 89% a los 3 meses, que disminuye a un 68% a los 12 meses de tratamiento, la TFD tiene algunas limitaciones que han motivado a los investigadores a buscar factores que optimicen la respuesta al tratamiento. Se han probado diferentes formas de incrementar su eficacia y mejorar su rendimiento a nivel práctico, como el pretratamiento con diferentes técnicas físicas y láseres (67) o la combinación con otros tratamientos como 5-fluorouracilo, imiquimod o calcitriol, con diversidad de resultados(172). El hallazgo de que el pretratamiento con calcipotriol en un modelo murino de CEC inducido por RUV incrementaba la muerte celular mediada por TFD(164) ha motivado esta tesis al llevarnos a investigar cuál era la influencia de los niveles de vitamina D y de su receptor en la efectividad de este tratamiento.

Hemos observado una posible influencia de la vitamina D en la respuesta de las QA a la TFD, evidenciada en la asociación de un nivel sérico deficiente de vitamina D con una ausencia de respuesta histológica a TFD, una respuesta clínica significativamente mayor ante una expresión basal de VDR inferior, y la asociación de la respuesta clínica con los polimorfismos BsmI y TaqI del gen del VDR y del polimorfismo rs11023380 del gen CYP2R1 de la 25-hidroxilasa con la respuesta histológica. Además, encontramos que la respuesta histológica se asocia a niveles de colesterol LDL más altos, y que la respuesta clínica es superior en niveles de HDL más bajos.

Por último, hemos observado que la TFD induce cambios en la expresión de diferentes marcadores que pueden estar relacionados con su efectividad: reducción significativa de la expresión de ki67 y p53, reducción significativa de la expresión de aurora B y survivina, y un incremento marginalmente significativo de la expresión del VDR.

E.1. Efectividad de la TFD y cambios producidos por el tratamiento

El presente estudio muestra una alta tasa de efectividad de la TFD con MAL en la queratosis actínica, medida a las 6 semanas tras el tratamiento, siendo esta respuesta superior en las QA grado clínico de Olsen II. Las tasas de respuesta observadas son similares a estudios previos(173). Observamos una mayor respuesta a tratamiento en las QA grado II de Olsen, lo cual es coherente con la evidencia de que las lesiones de grado III con hiperqueratosis muestran una respuesta inferior a TFD.

Desde el punto de vista histológico, apreciamos una mayor respuesta en las QA de grado histológico KIN II. Es posible que la eficacia de la terapia esté limitada por un menor alcance cuando la atipia celular está confinada a las capas más bajas de la epidermis, en el caso de las KIN I y que sea inferior también en las lesiones más gruesas e hiperqueratósicas (KIN III), siendo lo último coherente con la literatura previa.

La TFD con MAL redujo, en nuestra experiencia, de forma significativa la expresión ki67, p53, survivina y aurora B, siendo el inmunomarcaje con VDR el único marcador cuya mayor expresión en nuestro estudio se asocia a una mejor respuesta a la TFD. Los niveles séricos deficientes de VD determinan una respuesta significativamente inferior al tratamiento, y niveles superiores de colesterol total y colesterol-LDL, e inferiores de HDL asocian una respuesta de las QA a la TFD con MAL significativamente superior.

E.2. Niveles séricos de vitamina D

En nuestra muestra se aprecia una tendencia a que los niveles séricos de 25(OH)D sean inferiores a la media en pacientes que muestran una respuesta clínica parcial o insuficiente de sus QA tras una sesión de TFD, y superiores a la media en aquellos con respuesta clínica completa. En el caso de la respuesta histológica, la media del grupo de pacientes sin respuesta se encontraba en niveles medios de deficiencia de vitamina D, mientras que aquellos con respuesta histológica presentaban niveles superiores. Nuestros hallazgos sugieren por tanto que niveles bajos de VD determinan una menor efectividad de TFD en el tratamiento de las queratosis actínicas.

La VD actúa como un agente clave en el queratinocito, a través de su unión al VDR expresado en la membrana de éste, inhibiendo su proliferación y promoviendo su diferenciación, protegiéndolo de las mutaciones inducidas por RUV, directamente e indirectamente al estimular la capacidad de p53 de reparar las mutaciones en el ADN(150), y mediante la regulación de la inmunidad a nivel cutáneo (174). Se ha estudiado el perfil de expresión génica que se produce en el queratinocito sano bajo tratamiento con 1,25-OH-D, y de entre 12.600 genes estudiados, 82 estaban sobreexpresados y 16 infraexpresados, ilustrando la complejidad de la red de expresión génica que desencadena la señalización de VDR por parte de su ligando la VD. Entre los genes sobreexpresados se encuentran peptidilarginina desaminasas, calicreínas, inhibidores de serin proteasas, c-fos o Kruppel-like factor 4, todos ellos implicados en la diferenciación queratinocítica(175). No sólo la 1,25(OH)D es capaz de actuar sobre el VDR sino también los secosteroides análogos producidos endógenamente por CYP11A1 y CYP 27B1, que según se ha demostrado, actúan en varios tejidos incluida la epidermis sobre este receptor y los receptores de retinoides ROR α y ROR γ (139). En conjunto, la evidencia es clara acerca del papel clave del sistema VD-VDR en el mantenimiento de la diferenciación queratinocítica, y la inhibición de su proliferación, por tanto en la protección frente al CCNM(153).

El efecto de los niveles séricos de VD en la efectividad de la TFD no se ha estudiado hasta la fecha. Se ha experimentado en ratones con displasia y neoplasias cutáneas administrando VD tópica (calcipotriol) y sistémica previamente al tratamiento con ALA-TFD, resultando el pretratamiento, tanto tópico como sistémico, en un aumento de la intensidad de fluorescencia por acumulación de niveles varias veces superiores de PpIX(176), incrementando paralelamente la muerte celular tumoral. La mayor acumulación de PpIX se produce a expensas de un incremento en la actividad de la coproporfirina oxidasa(177) y un descenso de la ferroquelatasa. Sin embargo, en experiencia de Bay y cols.(178), en ratones con CEC inducido por RUV, no hay diferencias entre el retraso en la aparición de CEC que produce la TFD sola y el producido por TFD tras pretratamiento con calcipotriol.

Apenas se ha publicado sobre pretratamiento con VD en TFD en humanos. En la reunión anual de la Sociedad Europea de Terapia Fotodinámica en 2016, una muestra de 5 pacientes recibió tratamiento con MAL-PDT de las QA del cuero cabelludo, pretratándose una mitad del campo de tratamiento con calcipotriol tópico(179). Se observó una mayor reducción en número de queratosis actínicas en las áreas pretratadas con calcipotriol vs. las no pretratadas (89,3% vs. 77,7%). En la misma reunión en 2017, Torezan y cols. volvieron a explorar la influencia de calcipotriol en la efectividad de TFD, en 16 individuos con QA grados I y II en un ensayo *split-scalp* pretratando una mitad del cuero cabelludo con calcipotriol y tratando con TFD ambas mitades, encontrando una respuesta clínica ligeramente superior en lado pretratado (resolución de QA de 91,5% vs. 81,5%) con diferencias más evidentes en el caso de las QA de grado II

(90,5% vs. 65,5%) (180). A partir de estos resultados proponen que calcipotriol puede aportar una mejoría de la efectividad de TFD en QA “difíciles de tratar”.

Sin embargo, y en contra de todo lo anterior, en experiencia de Nissen y cols.(181), el pretratamiento de 20 minutos con calcipotriol/betametasona tópico antes de la aplicación de MAL no produjo un incremento de la concentración de PPIX medida por fluorescencia, en comparación con la aplicación de MAL sin pretratamiento. Es preciso tener en cuenta que el tiempo de exposición al análogo de la VD es corto, y que la administración combinada de betametasona podría haber modificado el efecto del calcipotriol sobre la efectividad de la TFD. El mismo grupo investigador sugiere además, mediante un ensayo clínico aleatorizado en pacientes con QA en las manos, que el incremento en la acumulación de PPIX producido por el curetaje previo a la aplicación de MAL no mejora la eficacia de la TFD en estas condiciones(182).

Se plantea por tanto la hipótesis de que calcitriol y calcipotriol administrados previamente a la TFD con MAL incrementen la eficacia del tratamiento por otros mecanismos diferentes a la acumulación de PPIX. Tal y como se ha descrito, el pretratamiento con calcitriol seguido de ALA-TFD en CBC murino, induce un incremento en la expresión de marcadores de diferenciación celular (E-cadherina), proliferación (Ki67) y apoptosis (TUNEL), a diferencia del pretratamiento con placebo seguido de ALA-PDT (167). Por todo ello, nuestros hallazgos son consistentes con la evidencia disponible, acerca de una mayor efectividad de TFD bajo el efecto de la VD, aunque el incremento en la acumulación de PPIX no sea suficiente para explicar este beneficio en el tratamiento.

E.3. VDR

En nuestra experiencia, TFD con MAL indujo un incremento marginalmente significativo en la proporción de núcleos celulares que expresan VDR, aunque no se apreciaron diferencias significativas en la intensidad de tinción nuclear. Además, hemos observado que los pacientes con una respuesta clínica global completa a TFD presentaban un porcentaje de expresión de VDR significativamente menor que aquellos con respuestas parciales.

En la valoración de la inmunotinción VDR sólo se ha tenido en cuenta la tinción a nivel nuclear, sin reparar específicamente en la expresión de VDR citoplásmico. Se ha descrito en cerdos alimentados con dieta deficiente en VD que, en los queratinocitos, la insuficiencia de vitamina D conlleva una tinción VDR difusa en el citoplasma y más tenue a nivel nuclear, mientras que en sus homólogos con suficiencia de VD, la tinción se hace más intensa a nivel nuclear (183). VDR parece distribuirse en un mayor equilibrio entre núcleo y citoplasma en ausencia de su

ligando, mientras que niveles séricos más altos de VD, que según parece lógico aumentan la disponibilidad de ligando para el receptor en la epidermis, promueven un desplazamiento del VDR hacia una predominancia nuclear.

Datos no publicados de nuestro equipo de investigación, en un estudio para comprobar in vitro los efectos citotóxicos del calcitriol sobre dos líneas celulares de CEC (A431 de carcinoma escamoso de vulva y SCC13 de carcinoma escamoso facial), muestran que basalmente el VDR tiene una localización predominantemente citoplasmática en ambas líneas celulares; sin embargo, tras el tratamiento con calcitriol, la expresión de VDR es exclusivamente nuclear en células A431 y predomina en núcleo en SCC13. Además, mediante western-blot se evidencia un incremento de la expresión total de VDR en ambas líneas tras el tratamiento con calcitriol.

Hasta la fecha no se ha publicado sobre los efectos de la TFD sobre la expresión de VDR. Nuestros datos, sugieren que TFD podría aumentar la expresión nuclear de VDR, lo que aumentaría la sensibilidad de los queratinocitos atípicos a la VD. Teniendo en cuenta que la unión de la VD a su receptor tiene sobre los queratinocitos propiedades reguladoras de la proliferación y promotoras de la reparación del daño en el ADN(174), éste podría ser uno más de los múltiples mecanismos por los cuales la TFD revierte el proceso carcinogénico.

E.4. Polimorfismos del VDR y genes relacionados

De entre los polimorfismos del gen del VDR y los genes de la vía de la VD VDBP(GC), CYP2R1, LRP5 y DHCR7/NADSYN1 estudiados, se halló una respuesta clínica global a TFD significativamente inferior para los genotipos heterocigotos de *BsmI* (rs1544410) y *TaqI* (rs731236) del VDR, y la respuesta histológica de las QA a TFD significativamente inferior en pacientes con genotipo heterocigoto para el SNP rs11023380 del gen del CYP2R1.

El polimorfismo *TaqI* (rs731236) es un polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) que afecta al codón 352 en el exón 9 del VDR. El genotipo TT para este SNP se ha asociado a niveles inferiores de VD activa circulante(184). *BsmI* (rs1544410) es un RFLP en el intrón 8, en el extremo 3' del gen VDR, que aunque se considera silente porque no modifica la secuencia aminoacídica, puede afectar la estabilidad del ARNm y modificar la expresión del gen(185). Ambos se encuentran localizados hacia el extremo 3' del gen del VDR junto con *Apal* y un polimorfismo poli-A de longitud microsatélite, encontrándose entre ellos en fuerte desequilibrio de ligamiento, por lo que tienen poca probabilidad de segregarse de manera independiente. El alelo variante del polimorfismo poli-A se encuentra relacionado con una menor actividad del VDR, por lo que se espera de los alelos *wild-type* de *BsmI* y *Apal* y de la variante de *TaqI* que igualmente estén relacionados con una menor actividad del receptor. Por

último, se ha sugerido un mecanismo de feedback negativo por parte de VDR en la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a través de la $1-\alpha$ -hidroxilasa (186).

En QA se han estudiado los SNPs *Apal*, *TaqI* y *FokI*, y se ha hallado un riesgo significativamente mayor de desarrollar QA para los genotipos homocigotos de *Apal* y *TaqI*, mientras que el genotipo heterocigoto parece conferir una cierta protección frente al desarrollo de QA (163). Se habla de “ventaja heterocigota” de estos polimorfismos. Es posible que la formación de heterodímeros *wild-type*/variante a nivel de estos *loci* altere la capacidad de unión del VDR para dimerizar con otros receptores o podría alterar la capacidad de unión al ADN, por tanto, influyendo directamente en la transcripción.

En cuanto al polimorfismo rs11023380 del gen CYP21, también se ha asociado recientemente a los niveles basales de VD(187) y a la respuesta a la suplementación con VD en deficiencia. Además, otras mutaciones de este gen asocian deficiencia de VD (188). Dado que el gen CYP21 codifica la proteína 21-hidroxilasa, clave en la síntesis final de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, metabolito activo de la VD, parece lógico que sus polimorfismos modifiquen su función e influyan en sus niveles.

Se ha investigado profusamente sobre polimorfismos de estos genes y riesgo de desarrollar determinadas patologías. Sin embargo no abundan estudios que investiguen los polimorfismos del gen del VDR o CYP21 como predictores de la respuesta a tratamientos. Resulta interesante la asociación hallada entre los genotipos heterocigotos de *BsmI* y *Apal* y una menor efectividad de la TFD, estando ambos en un fuerte desequilibrio de ligamiento y habiendo evidencia de que el genotipo heterocigoto de *Apal* asocia un menor riesgo de desarrollar QA (163). Parece plausible que el efecto de TFD sobre QA esté, en parte, mediado por la función del VDR, y se modifique ante mutaciones que alteran su funcionalidad. También la asociación hallada con un polimorfismo del gen de la 21-hidroxilasa que influye en los niveles de VD señala, consistentemente con otros resultados de nuestro estudio, una modificación de la efectividad de TFD por los niveles de VD.

E.5. Lípidos séricos

Los lípidos juegan un papel importante en la función y la integridad celular. Los fosfolípidos son los lípidos principales en la membrana celular mientras que los triglicéridos se almacenan como reservorios de energía. Las LDL, sintetizadas principalmente en el hígado, son transportadas en el torrente sanguíneo para aportar triglicéridos y colesterol a células con receptor para LDL, y las HDL devuelven el colesterol principalmente transportándolo al hígado.

Hasta ahora no se ha relacionado la eficacia de la TFD sobre QA con posibles marcadores bioquímicos en humanos como la VD sérica o su molécula precursora, el colesterol. Sobre los lípidos plasmáticos, nuestro estudio muestra una tendencia a que los pacientes con unos niveles de colesterol total superiores presenten una mejor respuesta clínica e histológica, aunque no se observa significación estadística en esta relación. Sin embargo, la respuesta clínica global completa se asoció significativamente a unos niveles de HDL inferiores, y la respuesta histológica fue completa ante niveles de LDL significativamente superiores. En conjunto, nuestros resultados sugieren una efectividad de la TFD mayor ante un perfil lipídico en el que predomina en el compartimento circulatorio una mayor disponibilidad de colesterol para su empleo por los diferentes tejidos.

Se ha descrito una tendencia de los pacientes con QA y CBC a mostrar niveles superiores de colesterol y triglicéridos que los pacientes sanos(189). Este grupo de trabajo sobre lípidos y estrés oxidativo plantea que un incremento en la fracción de fosfolípidos séricos metabólicamente activos se refleja en una mayor presencia de fosfolípidos en el tejido neoplásico, lo cual produce proporciones alteradas en las fracciones lipídicas en áreas tumorales que puede resultar en cambios en la membrana celular y en el potencial celular de diseminación y proliferación maligna. Un estudio de casos controles más reciente, sin embargo, no halla diferencias significativas entre los niveles de lípidos sanguíneos de pacientes con CBC y los de los controles (190).

Colesterol y ácidos grasos poliinsaturados son importantes sustratos para la peroxidación lipídica, y su oxidación enzimática y no enzimática produce una variedad de productos que pueden tener una acción citotóxica(191). Entre los diversos mecanismos de acción de la TFD se encuentra la producción de especies reactivas de oxígeno que oxidan y dañan estructuras de membrana y organelas. Se ha sugerido que la oxidación de colesterol y ácidos grasos, como componentes estructurales de la membrana celular, y puesto que muchos fotosensibilizantes son lipofílicos, ha de ser una mecanismo prominente de muerte celular debida al estrés oxidativo inducido por la TFD (192).

Por último, el colesterol es no solo el precursor de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ producida por la vía clásica de hidroxilación, sino también de los análogos alternativos de síntesis endógena ya mencionados(139), y la combinación de la VD clásica y estos secosteroides ha de producir una compleja variedad de efectos sobre proliferación y diferenciación queratinocítica aún no bien conocidos.

Nuestros hallazgos relacionando la efectividad de la TFD con un perfil de colesterol “menos saludable”, con mejores resultados ante niveles superiores de colesterol total y LDL e inferiores

de HDL, por tanto, con mayor disponibilidad sérica de colesterol transportado hacia los tejidos, podrían indicar un papel de los lípidos sanguíneos en la eficacia de la TFD. Es posible que este papel esté relacionado con el daño oxidativo inducido por TFD, y puede que sus efectos estén mediados por la unión a VDR y receptores de retinoides en los queratinocitos, aunque son necesarios estudios apropiados para confirmar estas hipótesis.

E.6. Ki67 y p53

La reducción en la expresión del marcador de proliferación Ki67 y de la proteína p53 relacionada con la carcinogénesis epidérmica en QA tratadas con MAL-TFD ya se ha descrito previamente(102), indicando que el tratamiento con TFD produce una “normalización” de la displasia epidérmica, revirtiendo de esta manera el proceso carcinogénico. En nuestra muestra, el tratamiento con TFD de las QA produce un descenso estadísticamente significativo del inmunomarcaje de ki67 y p53 consistente con la literatura.

Ki67 es un marcador de proliferación celular que se expresa en todas las fases del ciclo celular salvo en M0. Por tanto, se expresa fisiológicamente en la capa basal de la epidermis. La expresión de Ki67 está aumentada en QA(193) relacionándose con el crecimiento queratinocítico desordenado propio de los cambios displásicos. La reducción en la presencia de células en proliferación inducido por TFD se relaciona con una mayor actividad de la vía del grupo hemo en estas células(194), la cual es responsable de que la PpIX se acumule selectivamente en ellas, siendo por tanto las principalmente afectadas por su fotoactivación durante la TFD.

P53 es una proteína presente en piel sana fotoexpuesta (44) y está mutada en el 50% de las QA (45), resultando su mutación inactivadora, por lo que pierde su capacidad de inducir la apoptosis de células dañadas. Aunque por inmunotinción no es posible diferenciar p53 mutada de p53 no mutada, la proteína mutada se considera más estable, por lo que en general la sobreexpresión observada por inmunohistoquímica se considera indicadora de la presencia de p53 mutante. El efecto observado en nuestro trabajo y en la literatura de la capacidad de TFD de reducir la expresión de p53 mutante es coherente con la capacidad de revertir el proceso carcinogénico de esta terapia.

E.7. Survivina y Aurora B

Este trabajo halla un descenso estadísticamente significativo de la expresión de survivina y de aurora B kinasa después del tratamiento fotodinámico en comparación con la expresión basal,

datos que no han sido publicados hasta la fecha. Estas dos proteínas relacionadas con el normal desarrollo de la mitosis aparecen sobreexpresadas en varios cánceres humanos. Survivina es una proteína inhibidora de la apoptosis, presente en queratinocitos normales y cuya expresión está aumentada en QA y es máxima en CEC epidérmico, contribuyendo a su progresión. Se ha demostrado que la expresión de survivina está regulada negativamente por p53 no mutado y que participa en la vía apoptótica iniciada por esta proteína pro-apoptótica (195).

En diferentes líneas celulares de cáncer, la sobreexpresión de survivina ha demostrado estar relacionada con quimio- y radorresistencia (196) (197). En células de cáncer de mama expuestas a TFD se produce un aumento en la expresión y fosforilación de survivina que se relaciona con la resistencia al tratamiento(198). También se ha estudiado el efecto de TFD sobre survivina en líneas celulares de queratinocitos de CEC sometidos in vitro a varias sesiones sucesivas de ALA-TFD, observándose que la expresión de survivina fosforilada aumenta en la población de queratinocitos resistentes seleccionada por TFD respecto de la población parental(199).

Hasta el momento no se ha investigado el efecto de TFD en la expresión de survivina en QA. Un trabajo reciente en 16 pacientes tratados con TFD de su queilitis actínica, la neoplasia queratinocítica intraepidérmica de la semimucosa labial, no halla diferencias significativas en la expresión de survivina tras TFD(200). En nuestra experiencia, TFD produjo un descenso significativo de la expresión de survivina en QA tratadas; es probable, por tanto, que si el incremento en survivina se asocia a progresión y resistencia a tratamientos, un descenso en la expresión de esta proteína antiapoptótica esté relacionado con la inversión de la displasia, por tanto con la efectividad de TFD en tratar la QA, aunque se desconoce el mecanismo por el que TFD induce estos cambios.

La expresión de aurora B kinasa en QA no se ha descrito, ni el efecto que tiene la TFD sobre ella. Sin embargo, puesto que survivina se encuentra sobreexpresada en la displasia queratinocítica (47), es posible que la reducción de la expresión de estas dos proteínas antiapoptóticas sea parte del mecanismo de acción de TFD sobre las QA. Este trabajo muestra que las QA tratadas que muestran una mayor respuesta histológica a TFD presentan una expresión superior de survivina y aurora B; en el caso de aurora B esta diferencia es estadísticamente significativa. Los hallazgos sugieren el potencial de estas dos proteínas reguladoras de la mitosis como factores predictores en la respuesta a TFD y posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de la displasia queratinocítica, siendo aurora B Kinasa el único marcador inmunohistoquímico asociado de forma estadísticamente significativa a la respuesta histológica de las QA a la TFD con MAL en nuestra muestra.

E.8. Limitaciones del estudio

La principal limitación del estudio es el pequeño tamaño de la muestra, que reduce la posibilidad de hallar asociaciones estadísticamente significativas de la efectividad la TFD con todas las variables recogidas. Esta muestra de 25 pacientes forma parte de un estudio de mayor tamaño muestral cuyo objetivo principal es determinar el papel del sistema VD-VDR y de otros biomarcadores clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos en la respuesta de las QA a TFD, y que también explora el papel de este sistema en la respuesta de las QA a otros tratamientos.

Otra limitación adicional es un cierto sesgo de selección al haber escogido para estudio histológico las QA clínicamente más graves, con el consiguiente factor añadido de que por lo general muestran mayor hiperqueratosis y otras características que podrían limitar su validez como lesiones representativas del conjunto de QA a la hora de evaluar los efectos de la TFD. Además, el estudio comparativo entre dos biopsias consecutivas de una misma lesión se basa en la asunción de que los cambios moleculares son extrapolables a distintas áreas de una misma QA, lo cual no puede afirmarse con total seguridad. Tratándose de lesiones pequeñas además se encuentra el riesgo de que la cicatrización de la primera biopsia induzca de algún modo cambios en la proximidad que puedan afectar a la segunda biopsia.

Por último, la efectividad ha sido medida a corto plazo (6 semanas tras el tratamiento). La valoración se hizo en este momento por similitud con otros trabajos publicados por nuestro grupo sobre TFD en QA. En este sentido, nos parece interesante valorar la respuesta clínica de la TFD a largo plazo (6 meses de seguimiento) y analizar de nuevo su relación con los parámetros estudiados.

F. Conclusiones

1.El sistema vitamina D-VDR parece influir en la respuesta de las queratosis actínicas a la TFD con MAL ya que:

A) Niveles séricos deficientes VD se asocian significativamente a una falta de respuesta histológica al tratamiento.

B) Se observó una respuesta clínica significativamente mayor a la TFD ante una expresión basal de VDR inferior

C) La presencia de los polimorfismos BsmI y TaqI del gen del VDR y del polimorfismo rs11023380 del CYP2R1 de la 25-hidroxilasa han demostrado asociación significativa con la respuesta a TFD con mal tanto clínica como histológicamente.

2. El perfil sérico de colesterol y proteínas transportadoras HDL y LDL se asocia significativamente a la respuesta de las QA a TFD con MAL

3. El tratamiento de las QA con TFD tiene efectos sobre la proliferación, la apoptosis y la diferenciación de los queratinocitos que podrían estar relacionados con su efectividad, debido a que:

A) Reduce significativamente la expresión en queratinocitos displásicos de p53, marcador de oncogénesis temprana y regulador de apoptosis, y de ki67, marcador de proliferación, hallazgos que corroboran lo ya publicado en la literatura.

B) Reduce significativamente la expresión de Aurora B y Survivina, proteínas reguladoras de la apoptosis

C) Produce un incremento marginalmente significativo en la expresión nuclear de VDR

4. Aurora B kinasa se sobreexpresa en queratosis actínicas. Dicha expresión se correlaciona de forma positiva con la respuesta de esta enfermedad a la TFD con MAL, perfilándose como un posible biomarcador predictor respuesta de las QA a la TFD con MAL.

G. Financiación

El desarrollo de esta tesis doctoral ha contado con las siguientes fuentes de financiación:

- Título del proyecto: “**Determinación de marcadores de resistencia a terapia fotodinámica en el tratamiento de cáncer cutáneo no melanoma y búsqueda de estrategias para superarla**”. Entidad financiadora: Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Economía y Competitividad (PI15/00974). Duración: 01/01/2016-31/12/2018. Investigador responsable: Ángeles Juarranz de la Fuente.

- - Título del proyecto: “**Potential impact of vitamin D status of the patients in the response of actinic keratoses to MAL-PDT**”. Galderma Research and Development; Galderma (Francia). Investigador responsable: Yolanda Gilaberte

H. Bibliografía

1. LeBoit P, Burg G, Weedon D, Sarasain A. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. 2006.
2. Werner RN, Sammain A, Erdmann R, Hartmann V, Stockfleth E, Nast A. The natural history of actinic keratosis: a systematic review. *Br J Dermatol*. 2013 Sep;169(3):502–18.
3. Olsen EA, Abernethy ML, Kulp-Shorten C, Callen JP, Glazer SD, Huntley A, et al. A double-blind, vehicle-controlled study evaluating masoprocol cream in the treatment of actinic keratoses on the head and neck. *J Am Acad Dermatol*. 1991 May;24(5 Pt 1):738–43.
4. R wert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *Br J Dermatol*. 2007 May;156 Suppl 3:8–12.
5. Marks R, Rennie G, Selwood TS. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet*. 1988 Apr 9;1(8589):795–7.
6. Criscione VD, Weinstock MA, Naylor MF, Luque C, Eide MJ, Bingham SF, et al. Actinic keratoses: Natural history and risk of malignant transformation in the Veterans Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial. *Cancer*. 2009 Jun 1;115(11):2523–30.
7. Rapini RP, Jorizzo JL, Bologna J. *Dermatología*. Madrid: Elsevier; 2004.
8. Aslan F, Demirkesen C, Ca atay P, T z ner N. Expression of cytokeratin subtypes in intraepidermal malignancies: a guide for differentiation. *J Cutan Pathol*. 2006 Aug;33(8):531–8.
9. Takayama R, Ishiwata T, Ansai S, Yamamoto T, Matsuda Y, Naito Z, et al. Lumican as a novel marker for differential diagnosis of Bowen disease and actinic keratosis. *Am J Dermatopathol*. 2013 Dec;35(8):827–32.
10. Ramzi ST, Maruno M, Khaskhely NM, Khan MAK, Takamiyagi A, Uezato H, et al. An assessment of the malignant potential of actinic keratoses and Bowen’s disease: p53 and PCNA expression pattern correlate with the number of desmosomes. *J Dermatol*. 2002 Sep;29(9):562–72.
11. Johnson TM, Rowe DE, Nelson BR, Swanson NA. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J Am Acad Dermatol*. 1992 Mar;26(3 Pt 2):467–84.
12. Wilmer EN, Gustafson CJ, Ahn CS, Davis SA, Feldman SR, Huang WW. Most common dermatologic conditions encountered by dermatologists and nondermatologists. *Cutis*. 2014 Dec;94(6):285–92.
13. Flohil SC, van der Leest RJT, Dowlatshahi EA, Hofman A, de Vries E, Nijsten T. Prevalence of actinic keratosis and its risk factors in the general population: the Rotterdam Study. *J Invest Dermatol*. 2013 Aug;133(8):1971–8.
14. Naldi L, Chatenoud L, Piccitto R, Colombo P, Placchesi EB, La Vecchia C, et al. Prevalence of actinic keratoses and associated factors in a representative sample of the Italian adult population: Results from the Prevalence of Actinic Keratoses Italian Study, 2003-2004. *Arch Dermatol*. 2006 Jun;142(6):722–6.
15. Eder J, Prillinger K, Korn A, Geroldinger A, Trautinger F. Prevalence of actinic keratosis among dermatology outpatients in Austria. *Br J Dermatol*. 2014 Dec;171(6):1415–21.
16. Ferrándiz C, Plazas MJ, Sabat  M, Palomino R, EPIQA Study Group. Prevalence of actinic keratosis among dermatology outpatients in Spain. *Actas Dermosifiliogr*. 2016 Oct;107(8):674–80.
17. Schaefer I, Augustin M, Spehr C, Reusch M, Kornek T. Prevalence and risk factors of actinic keratoses in Germany--analysis of multisource data. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2014 Mar;28(3):309–13.
18. Traianou A, Ulrich M, Apalla Z, De Vries E, Bakirtzi K, Kalabalikis D, et al. Risk factors for actinic keratosis in eight European centres: a case-control study. *Br J Dermatol*. 2012 Aug;167 Suppl 2:36–42.
19. Rigel DS, Rigel EG, Rigel AC. Effects of altitude and latitude on ambient UVB radiation. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Jan;40(1):114–6.
20. Curry JL, Torres-Cabala CA, Kim KB, Tetzlaff MT, Duvic M, Tsai KY, et al. Dermatologic toxicities to targeted cancer therapy: shared clinical and histologic adverse skin reactions. *Int J Dermatol*. 2014 Mar;53(3):376–84.
21. Sanchez-Palacios C, Guitart J. Hydroxyurea-associated squamous dysplasia. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Aug;51(2):293–300.
22. Muranushi C, Olsen CM, Pandeya N, Green AC. Aspirin and nonsteroidal anti-

- inflammatory drugs can prevent cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *J Invest Dermatol*. 2015 Apr;135(4):975–83.
23. Savoia P, Stroppiana E, Cavaliere G, Osella-Abate S, Mezza E, Segoloni GP, et al. Skin cancers and other cutaneous diseases in renal transplant recipients: a single Italian center observational study. *Eur J Dermatol EJD*. 2011 Apr;21(2):242–7.
 24. Wallingford SC, Russell SA, Vail A, Proby CM, Lear JT, Green AC. Actinic Keratoses, Actinic Field Change and Associations with Squamous Cell Carcinoma in Renal Transplant Recipients in Manchester, UK. *Acta Derm Venereol*. 2015 Mar 18;
 25. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
 26. Yantsos VA, Conrad N, Zabawski E, Cockerell CJ. Incipient intraepidermal cutaneous squamous cell carcinoma: a proposal for reclassifying and grading solar (actinic) keratoses. *Semin Cutan Med Surg*. 1999 Mar;18(1):3–14.
 27. Fernández-Figueras MT, Carrato C, Sáenz X, Puig L, Musulen E, Ferrándiz C, et al. Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2014 Nov 26;
 28. Fernandez Figueras MT. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: pathophysiology revisited. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2017 Mar;31 Suppl 2:5–7.
 29. Harvey I, Frankel S, Marks R, Shalom D, Nolan-Farrell M. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses II analytical results of the South Wales Skin Cancer Study. *Br J Cancer*. 1996 Oct;74(8):1308–12.
 30. Brash DE. UV signature mutations. *Photochem Photobiol*. 2015 Feb;91(1):15–26.
 31. Dubina M, Goldenberg G. Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review. *Am J Dermatopathol*. 2009 Aug;31(6):561–73.
 32. Vasiljevic N, Hazard K, Dillner J, Forslund O. Four novel human betapapillomaviruses of species 2 preferentially found in actinic keratosis. *J Gen Virol*. 2008 Oct;89(Pt 10):2467–74.
 33. Feltkamp MCW, de Koning MNC, Bavinck JNB, Ter Schegget J. Betapapillomaviruses: innocent bystanders or causes of skin cancer. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2008 Dec;43(4):353–60.
 34. Karagas MR, McDonald JA, Greenberg ER, Stukel TA, Weiss JE, Baron JA, et al. Risk of basal cell and squamous cell skin cancers after ionizing radiation therapy. For The Skin Cancer Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Dec 18;88(24):1848–53.
 35. Copcu E. Marjolin's ulcer: a preventable complication of burns? *Plast Reconstr Surg*. 2009 Jul;124(1):156e–64e.
 36. Carlson JA, Ambros R, Malfetano J, Ross J, Grabowski R, Lamb P, et al. Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia. *Hum Pathol*. 1998 Sep;29(9):932–48.
 37. Micheletti L, Preti M, Radici G, Boveri S, Di Pumpo O, Privitera SS, et al. Vulvar Lichen Sclerosus and Neoplastic Transformation: A Retrospective Study of 976 Cases. *J Low Genit Tract Dis*. 2016 Apr;20(2):180–3.
 38. Yu H-S, Liao W-T, Chai C-Y. Arsenic carcinogenesis in the skin. *J Biomed Sci*. 2006 Sep;13(5):657–66.
 39. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953 Sep;6(5):963–8.
 40. Jeffes EW, Tang EH. Actinic keratosis. Current treatment options. *Am J Clin Dermatol*. 2000 Jun;1(3):167–79.
 41. Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, Valente N, Unger P, Kohl E, et al. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2012 Jul;167(1):150–9.
 42. Dotto GP. Multifocal epithelial tumors and field cancerization: stroma as a primary determinant. *J Clin Invest*. 2014 Apr;124(4):1446–53.
 43. Lanoue J, Chen C, Goldenberg G. Actinic keratosis as a marker of field cancerization in excision specimens of cutaneous malignancies. *Cutis*. 2016 Jun;97(6):415–20.
 44. Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14025–9.

45. Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL, et al. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett.* 1994 Sep 30;85(1):23–9.
46. Gully CP, Velazquez-Torres G, Shin J-H, Fuentes-Mattei E, Wang E, Carlock C, et al. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 12;109(24):E1513–1522.
47. Dallaglio K, Petrachi T, Marconi A, Truzzi F, Lotti R, Saltari A, et al. Expression of nuclear survivin in normal skin and squamous cell carcinoma: a possible role in tumour invasion. *Br J Cancer.* 2014 Jan 7;110(1):199–207.
48. Dallaglio K, Marconi A, Pincelli C. Survivin: a dual player in healthy and diseased skin. *J Invest Dermatol.* 2012 Jan;132(1):18–27.
49. Grossman D, Kim PJ, Blanc-Brude OP, Brash DE, Tognin S, Marchisio PC, et al. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest.* 2001 Oct 1;108(7):991–9.
50. Mastoraki A, Ioannidis E, Apostolaki A, Patsouris E, Aroni K. PGP 9.5 and cyclin D1 coexpression in cutaneous squamous cell carcinomas. *Int J Surg Pathol.* 2009 Dec;17(6):413–20.
51. Bito T, Ueda M, Ahmed NU, Nagano T, Ichihashi M. Cyclin D and retinoblastoma gene product expression in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in relation to p53 expression. *J Cutan Pathol.* 1995 Oct;22(5):427–34.
52. Brasanac D, Stojkovic-Filipovic J, Bosic M, Tomanovic N, Manojlovic-Gacic E. Expression of G1/S-cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 2016 Mar;43(3):200–10.
53. Singh B, Schneider M, Knyazev P, Ullrich A. UV-induced EGFR signal transactivation is dependent on proligand shedding by activated metalloproteases in skin cancer cell lines. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2009 Feb 1;124(3):531–9.
54. Toll A, Salgado R, Yébenes M, Martín-Ezquerro G, Gilaberte M, Baró T, et al. Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp Dermatol.* 2010 Feb;19(2):151–3.
55. López-Camarillo C, Ocampo EA, Casamichana ML, Pérez-Plasencia C, Alvarez-Sánchez E, Marchat LA. Protein kinases and transcription factors activation in response to UV-radiation of skin: implications for carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2012;13(1):142–72.
56. Marinkovich MP. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer.* 2007 May;7(5):370–80.
57. Brasanac D, Boricic I, Todorovic V, Tomanovic N, Radojevic S. Cyclin A and beta-catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 2005 Dec;153(6):1166–75.
58. Elmetts CA, Ledet JJ, Athar M. Cyclooxygenases: mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. *J Invest Dermatol.* 2014 Oct;134(10):2497–502.
59. Ullrich SE. Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. *Mutat Res.* 2005 Apr 1;571(1–2):185–205.
60. De Fabo EC, Noonan FP. Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J Exp Med.* 1983 Jul 1;158(1):84–98.
61. Vink AA, Strickland FM, Bucana C, Cox PA, Roza L, Yarosh DB, et al. Localization of DNA damage and its role in altered antigen-presenting cell function in ultraviolet-irradiated mice. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1491–500.
62. Serra Guillén C, Longo Imedio IL, Fernández Guarino M. Tratamiento de las queratosis actínicas. In: *Pautas de actuación y seguimiento: queratosis actínica.* IM&C S.A.; 2015.
63. Thai K-E, Fergin P, Freeman M, Vinciullo C, Francis D, Spelman L, et al. A prospective study of the use of cryosurgery for the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol.* 2004 Sep;43(9):687–92.
64. Hoover WD, Jorizzo JL, Clark AR, Feldman SR, Holbrook J, Huang KE. Efficacy of cryosurgery and 5-fluorouracil cream 0.5% combination therapy for the treatment of actinic keratosis. *Cutis.* 2014 Nov;94(5):255–9.

65. Goldenberg G, Berman B. Assessment of local skin reactions with a sequential regimen of cryosurgery followed by ingenol mebutate gel, 0.015%, in patients with actinic keratosis. *Clin Cosmet Invest Dermatol*. 2015;8:1–8.
66. Jiang SB, Levine VJ, Nehal KS, Baldassano M, Kamino H, Ashinoff RA. Er:YAG laser for the treatment of actinic keratoses. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 2000 May;26(5):437–40.
67. Ostertag JU, Quaedvlieg PJF, Neumann MHAM, Krekels GA. Recurrence rates and long-term follow-up after laser resurfacing as a treatment for widespread actinic keratoses on the face and scalp. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 2006 Feb;32(2):261–7.
68. Cooley JE, Casey DL, Kauffman CL. Manual resurfacing and trichloroacetic acid for the treatment of patients with widespread actinic damage. Clinical and histologic observations. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. 1997 May;23(5):373–9.
69. Askew DA, Mickan SM, Soyer HP, Wilkinson D. Effectiveness of 5-fluorouracil treatment for actinic keratosis--a systematic review of randomized controlled trials. *Int J Dermatol*. 2009 May;48(5):453–63.
70. Herranz P, Morton C, Dirschka T, Azeredo RR, Roldán-Marín R. Low-Dose 0.5% 5-Fluorouracil/10% Salicylic Acid Topical Solution in the Treatment of Actinic Keratoses. *J Cutan Med Surg*. 2016 Nov;20(6):555–61.
71. Szeimies R-M, Dirschka T, Prechtel A, Melzer A. Efficacy of low-dose 5-fluorouracil/salicylic acid in actinic keratoses in relation to treatment duration. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. 2015 May;13(5):430–8.
72. Alomar A, Bichel J, McRae S. Vehicle-controlled, randomized, double-blind study to assess safety and efficacy of imiquimod 5% cream applied once daily 3 days per week in one or two courses of treatment of actinic keratoses on the head. *Br J Dermatol*. 2007 Jul;157(1):133–41.
73. Peris K, Stockfleth E, Gupta G, Aractingi S, Dakovic R, Dirschka T, et al. Efficacy of imiquimod 3.75% from Lmax according to the number of actinic keratosis lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2014 Oct 28;
74. Schön MP, Schön M. Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol*. 2007 Dec;157 Suppl 2:8–13.
75. Martin GM, Stockfleth E. Diclofenac sodium 3% gel for the management of actinic keratosis: 10+ years of cumulative evidence of efficacy and safety. *J Drugs Dermatol JDD*. 2012 May;11(5):600–8.
76. Gupta AK, Paquet M. Network meta-analysis of the outcome “participant complete clearance” in nonimmunosuppressed participants of eight interventions for actinic keratosis: a follow-up on a Cochrane review. *Br J Dermatol*. 2013 Aug;169(2):250–9.
77. Fecker LF, Stockfleth E, Nindl I, Ulrich C, Forschner T, Eberle J. The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Br J Dermatol*. 2007 May;156 Suppl 3:25–33.
78. Çayirli M, Köse O, Demiriz M. Clinical, dermoscopic and immunohistochemical assessment of actinic keratoses and evaluation of the effectiveness of diclofenac therapy with immunohistochemical analysis. *Arch Dermatol Res*. 2013 Jul;305(5):389–95.
79. Rodust PM, Fecker LF, Stockfleth E, Eberle J. Activation of mitochondrial apoptosis pathways in cutaneous squamous cell carcinoma cells by diclofenac/hyaluronic acid is related to upregulation of Bad as well as downregulation of Mcl-1 and Bcl-w. *Exp Dermatol*. 2012 Jul;21(7):520–5.
80. Fecker LF, Stockfleth E, Braun FK, Rodust PM, Schwarz C, Köhler A, et al. Enhanced death ligand-induced apoptosis in cutaneous SCC cells by treatment with diclofenac/hyaluronic acid correlates with downregulation of c-FLIP. *J Invest Dermatol*. 2010 Aug;130(8):2098–109.
81. Lebwohl M, Swanson N, Anderson LL, Melgaard A, Xu Z, Berman B. Ingenol mebutate gel for actinic keratosis. *N Engl J Med*. 2012 Mar 15;366(11):1010–9.
82. Lebwohl M, Shumack S, Stein Gold L, Melgaard A, Larsson T, Tyring SK. Long-term follow-up study of ingenol mebutate gel for the treatment of actinic keratoses. *JAMA Dermatol*. 2013 Jun;149(6):666–70.
83. Rosen RH, Gupta AK, Tyring SK. Dual mechanism of action of ingenol mebutate gel for topical treatment of actinic keratoses: rapid lesion necrosis followed by lesion-specific immune response. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Mar;66(3):486–93.

84. Morton CA, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H, et al. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol*. 2002 Apr;146(4):552–67.
85. Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol*. 1997 Feb;65(2):235–51.
86. Valentine RM, Ibbotson SH, Wood K, Brown CTA, Moseley H. Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2012 Dec 13;12(1):203–13.
87. Wiegell SR, Haedersdal M, Philipsen PA, Eriksen P, Enk CD, Wulf HC. Continuous activation of PpIX by daylight is as effective as and less painful than conventional photodynamic therapy for actinic keratoses; a randomized, controlled, single-blinded study. *Br J Dermatol*. 2008 Apr;158(4):740–6.
88. Wiegell SR, Wulf HC, Szeimies R-M, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Gerritsen M-JP, et al. Daylight photodynamic therapy for actinic keratosis: an international consensus: International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2012 Jun;26(6):673–9.
89. Wiegell SR, Fabricius S, Stender IM, Berne B, Kroon S, Andersen BL, et al. A randomized, multicentre study of directed daylight exposure times of 1½ vs. 2½ h in daylight-mediated photodynamic therapy with methyl aminolaevulinate in patients with multiple thin actinic keratoses of the face and scalp. *Br J Dermatol*. 2011 May;164(5):1083–90.
90. Wiegell SR, Haedersdal M, Eriksen P, Wulf HC. Photodynamic therapy of actinic keratoses with 8% and 16% methyl aminolaevulinate and home-based daylight exposure: a double-blinded randomized clinical trial. *Br J Dermatol*. 2009 Jun;160(6):1308–14.
91. Vrouenraets MB, Visser GWM, Snow GB, van Dongen GAMS. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Res*. 2003 Feb;23(1B):505–22.
92. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Sep 20;1704(2):59–86.
93. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, Heras DL, Elena M, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, et al. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2006 Mar 1;97(2):83–102.
94. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbélik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jun 17;90(12):889–905.
95. Korbélik M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg*. 1996 Oct;14(5):329–34.
96. Nakano A, Tamada Y, Watanabe D, Ishida N, Yamashita N, Kuhara T, et al. A pilot study to assess the efficacy of photodynamic therapy for Japanese patients with actinic keratosis in relation to lesion size and histological severity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2009 Feb;25(1):37–40.
97. Tyrrell JS, Morton C, Campbell SM, Curnow A. Comparison of protoporphyrin IX accumulation and destruction during methylaminolevulinate photodynamic therapy of skin tumours located at acral and nonacral sites. *Br J Dermatol*. 2011 Jun;164(6):1362–8.
98. Stender IM, Bech-Thomsen N, Poulsen T, Wulf HC. Photodynamic therapy with topical delta-aminolevulinic acid delays UV photocarcinogenesis in hairless mice. *Photochem Photobiol*. 1997 Oct;66(4):493–6.
99. Sharfaei S, Juzenas P, Moan J, Bissonnette R. Weekly topical application of methyl aminolevulinate followed by light exposure delays the appearance of UV-induced skin tumours in mice. *Arch Dermatol Res*. 2002 Jul;294(5):237–42.
100. Wulf HC, Pavel S, Stender I, Bakker-Wensveen CA. Topical photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant recipients. *Acta Derm Venereol*. 2006;86(1):25–8.
101. Sotiriou E, Apalla Z, Vrani F, Lallas A, Chovarda E, Ioannides D. Photodynamic therapy vs. imiquimod 5% cream as skin cancer preventive strategies in patients with field changes: a randomized intraindividual comparison study. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2015 Feb;29(2):325–9.

102. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, Jaén P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br J Dermatol*. 2011 Jul;165(1):144–51.
103. Farran A, Zamora R, Cervera P. Tablas de composición de alimentos del CESNID. Universitat de Barcelona; 2004.
104. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007 Jul 19;357(3):266–81.
105. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 May;85(10):3294–8.
106. Denzer N, Vogt T, Reichrath J. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and skin cancer: A systematic review. *Dermatoendocrinol*. 2011 Jul;3(3):205–10.
107. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 18;101(20):7711–5.
108. Sakaki T, Kagawa N, Yamamoto K, Inouye K. Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2005 Jan 1;10:119–34.
109. Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YEC. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2006 Oct;372(1–2):33–42.
110. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 May 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418485>
111. Ordóñez-Mena JM, Maalmi H, Schöttker B, Saum K-U, Holleczeck B, Wang TJ, et al. Genetic Variants in the Vitamin D Pathway, 25(OH)D Levels, and Mortality in a Large Population-Based Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Feb 1;102(2):470–7.
112. Sommer I, Griebler U, Kien C, Auer S, Klerings I, Hammer R, et al. Vitamin D deficiency as a risk factor for dementia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr*. 2017 Jan 13;17(1):16.
113. Shen L, Ji H-F. Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis. *Nutr J*. 2015 Aug 1;14:76.
114. Parker GB, Brotchie H, Graham RK. Vitamin D and depression. *J Affect Disord*. 2017 Jan 15;208:56–61.
115. Lucato P, Solmi M, Maggi S, Bertocco A, Bano G, Trevisan C, et al. Low vitamin D levels increase the risk of type 2 diabetes in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2017 Jun;100:8–15.
116. Lin J, Liu J, Davies ML, Chen W. Serum Vitamin D Level and Rheumatoid Arthritis Disease Activity: Review and Meta-Analysis. *PloS One*. 2016;11(1):e0146351.
117. Limketkai BN, Bechtold ML, Nguyen DL. Vitamin D and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2016 Oct;18(10):52.
118. Eloi M, Horvath DV, Ortega JC, Prado MS, Andrade LEC, Szejnfeld VL, et al. 25-Hydroxvitamin D Serum Concentration, Not Free and Bioavailable Vitamin D, Is Associated with Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *PloS One*. 2017;12(1):e0170323.
119. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J-C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord*. 2017 May;14:35–45.
120. Rajabbik MH, Lotfi T, Alkhaled L, Fares M, El-Hajj Fuleihan G, Mroueh S, et al. Association between low vitamin D levels and the diagnosis of asthma in children: a systematic review of cohort studies. *Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol*. 2014;10(1):31.
121. Mayor S. Taking vitamin D in addition to drugs reduces severe asthma attacks, finds review. *BMJ*. 2016 Sep 5;354:i4809.
122. Hejazi ME, Modarresi-Ghazani F, Entezari-Maleki T. A review of Vitamin D effects on common respiratory diseases: Asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and tuberculosis. *J Res Pharm Pract*. 2016 Mar;5(1):7–15.
123. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):1911–30.

124. Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Oct;144 Pt A:138–45.
125. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1678S–88S.
126. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med.* 2008 Aug 11;168(15):1629–37.
127. Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control CCC.* 2005 Mar;16(2):83–95.
128. Ng K, Wolpin BM, Meyerhardt JA, Wu K, Chan AT, Hollis BW, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and survival in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009 Sep 15;101(6):916–23.
129. Heist RS, Zhou W, Wang Z, Liu G, Neuberg D, Su L, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D, VDR polymorphisms, and survival in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 Dec 1;26(34):5596–602.
130. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol.* 2012;3:58.
131. Gandini S, Gnagnarella P, Serrano D, Pasquali E, Raimondi S. Vitamin D receptor polymorphisms and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2014;810:69–105.
132. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 Dec 19;420(6917):860–7.
133. Haverkamp J, Charbonneau B, Ratliff TL. Prostate inflammation and its potential impact on prostate cancer: a current review. *J Cell Biochem.* 2008 Apr 1;103(5):1344–53.
134. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—a review of recent evidence. *Autoimmun Rev.* 2013 Aug;12(10):976–89.
135. Khan MI, Bielecka ZF, Najm MZ, Bartnik E, Czarnecki JS, Czarnecka AM, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: current state and future approaches (review). *Int J Oncol.* 2014 Feb;44(2):349–63.
136. Ellison TI, Eckert RL, MacDonald PN. Evidence for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-independent transactivation by the vitamin D receptor: uncoupling the receptor and ligand in keratinocytes. *J Biol Chem.* 2007 Apr 13;282(15):10953–62.
137. Hill NT, Zhang J, Leonard MK, Lee M, Shamma HN, Kadakia M. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ and the vitamin D receptor regulates Δ Np63 α levels and keratinocyte proliferation. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1781.
138. Hu L, Bikle DD, Oda Y. Reciprocal role of vitamin D receptor on β -catenin regulated keratinocyte proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Oct;144 Pt A:237–41.
139. Slominski AT, Kim T-K, Hobrath JV, Oak ASW, Tang EKY, Tieu EW, et al. Endogenously produced nonclassical vitamin D hydroxy-metabolites act as “biased” agonists on VDR and inverse agonists on ROR α and ROR γ . *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Sep 28;
140. Slominski AT, Kim T-K, Takeda Y, Janjetovic Z, Brozyna AA, Skobowiat C, et al. ROR α and ROR γ are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2014 Jul;28(7):2775–89.
141. Albert B, Hahn H. Interaction of hedgehog and vitamin D signaling pathways in basal cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol.* 2014;810:329–41.
142. Mitschele T, Diesel B, Friedrich M, Meineke V, Maas RM, Gärtner BC, et al. Analysis of the vitamin D system in basal cell carcinomas (BCCs). *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 2004 Jun;84(6):693–702.
143. Kamradt J, Rafi L, Mitschele T, Meineke V, Gärtner BC, Wolfgang T, et al. Analysis of the vitamin D system in cutaneous malignancies. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Prog Dans Rech Sur Cancer.* 2003;164:259–69.
144. Zinser GM, Suckow M, Welsh J. Vitamin D receptor (VDR) ablation alters carcinogen-induced tumorigenesis in mammary gland, epidermis and lymphoid tissues. *J Steroid Biochem*

Mol Biol. 2005 Oct;97(1–2):153–64.

145. Wong G, Gupta R, Dixon KM, Deo SS, Choong SM, Halliday GM, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D and three low-calcemic analogs decrease UV-induced DNA damage via the rapid response pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89–90(1–5):567–70.
146. Tang JY, Xiao TZ, Oda Y, Chang KS, Shpall E, Wu A, et al. Vitamin D3 inhibits hedgehog signaling and proliferation in murine Basal cell carcinomas. *Cancer Prev Res Phila Pa*. 2011 May;4(5):744–51.
147. De Haes P, Garmyn M, Verstuyf A, De Clercq P, Vandewalle M, Degreef H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and analogues protect primary human keratinocytes against UVB-induced DNA damage. *J Photochem Photobiol B*. 2005 Feb 1;78(2):141–8.
148. Song EJ, Gordon-Thomson C, Cole L, Stern H, Halliday GM, Damian DL, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces several types of UV-induced DNA damage and contributes to photoprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Jul;136:131–8.
149. Moll PR, Sander V, Frischauf A-M, Richter K. Expression profiling of vitamin D treated primary human keratinocytes. *J Cell Biochem*. 2007 Feb 15;100(3):574–92.
150. Reichrath J, Reichrath S, Heyne K, Vogt T, Roemer K. Tumor suppression in skin and other tissues via cross-talk between vitamin D- and p53-signaling. *Front Physiol*. 2014;5:166.
151. Mason RS, Reichrath J. Sunlight vitamin D and skin cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013 Jan;13(1):83–97.
152. Li X, Wu Z, Fu X, Han W. Long Noncoding RNAs: Insights from Biological Features and Functions to Diseases. *Med Res Rev*. 2013 May;33(3):517–53.
153. Bikle DD, Jiang Y. The protective role of vitamin d signaling in non-melanoma skin cancer. *Cancers*. 2013;5(4):1426–38.
154. Gilaberte Y, Aguilera J, Carrascosa JM, Figueroa FL, Romaní de Gabriel J, Nagore E. La vitamina D: evidencias y controversias. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2011;102(8):572–88.
155. Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Jun;64(6):1165–8.
156. Farrerons J, Barnadas M, Rodríguez J, Renau A, Yoldi B, López-Navidad A, et al. Clinically prescribed sunscreen (sun protection factor 15) does not decrease serum vitamin D concentration sufficiently either to induce changes in parathyroid function or in metabolic markers. *Br J Dermatol*. 1998 Sep;139(3):422–7.
157. Linos E, Keiser E, Kanzler M, Sainani KL, Lee W, Vittinghoff E, et al. Sun protective behaviors and vitamin D levels in the US population: NHANES 2003–2006. *Cancer Causes Control CCC*. 2012 Jan;23(1):133–40.
158. Tang JY, Parimi N, Wu A, Boscardin WJ, Shikany JM, Chren M-M, et al. Inverse association between serum 25(OH) vitamin D levels and non-melanoma skin cancer in elderly men. *Cancer Causes Control CCC*. 2010 Mar;21(3):387–91.
159. Asgari MM, Tang J, Warton ME, Chren M-M, Quesenberry CP, Bikle D, et al. Association of prediagnostic serum vitamin D levels with the development of basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2010 May;130(5):1438–43.
160. Lesiak A, Norval M, Wodz-Naskiewicz K, Pawliczak R, Rogowski-Tylman M, Sysa-Jedrzejowska A, et al. An enhanced risk of basal cell carcinoma is associated with particular polymorphisms in the VDR and MTHFR genes. *Exp Dermatol*. 2011 Oct;20(10):800–4.
161. Köstner K, Denzer N, Koreng M, Reichrath S, Gräber S, Klein R, et al. Association of genetic variants of the vitamin D receptor (VDR) with cutaneous squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC): a pilot study in a German population. *Anticancer Res*. 2012 Jan;32(1):327–33.
162. VON Schuckmann LA, Law MH, Montgomery GW, Green AC, VAN DER Pols JC. Vitamin D Pathway Gene Polymorphisms and Keratinocyte Cancers: A Nested Case-Control Study and Meta-Analysis. *Anticancer Res*. 2016 May;36(5):2145–52.
163. Carless MA, Kraska T, Lintell N, Neale RE, Green AC, Griffiths LR. Polymorphisms of the VDR gene are associated with presence of solar keratoses on the skin. *Br J Dermatol*. 2008 Sep;159(4):804–10.
164. Anand S, Wilson C, Hasan T, Maytin EV. Vitamin D3 enhances the apoptotic response of epithelial tumors to aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer Res*. 2011 Sep 15;71(18):6040–50.
165. Parry PV, Engh JA. Calcitriol enhances 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence and

- the effect of photodynamic therapy in human glioma. *Neurosurgery*. 2014 Apr;74(4):N8-9.
166. Maytin EV, Honari G, Khachemoune A, Taylor CR, Ortel B, Pogue BW, et al. Vitamin D Combined with Aminolevulinate (ALA)-Mediated Photodynamic Therapy (PDT) for Human Psoriasis: A Proof-of-Principle Study. *Isr J Chem*. 2012 Sep;52(8-9):767-75.
167. Rollakanti K, Anand S, Maytin EV. Topical calcitriol prior to photodynamic therapy enhances treatment efficacy in non-melanoma skin cancer mouse models. *Proc SPIE-- Int Soc Opt Eng*. 2015 Mar 2;9308:93080Q.
168. Fitzpatrick TB. Soleil et peau. *J Med Esthet*. 1975;2:33-4.
169. Filosa A, Filosa G. Actinic keratosis and squamous cell carcinoma: clinical and pathological features. *G Ital Dermatol E Venereol Organo Uff Soc Ital Dermatol E Sifilogr*. 2015 Aug;150(4):379-84.
170. Stockfleth E. The importance of treating the field in actinic keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2017 Mar;31 Suppl 2:8-11.
171. Philipp-Dormston WG. Field cancerization: from molecular basis to selective field-directed management of actinic keratosis. *Curr Probl Dermatol*. 2015;46:115-21.
172. Taub AF, Schieber AC. New Methods for the Clinical Enhancement of Photodynamic Therapy. *J Drugs Dermatol JDD*. 2015 Nov;14(11):1329-34.
173. Vegter S, Tolley K. A Network Meta-Analysis of the Relative Efficacy of Treatments for Actinic Keratosis of the Face or Scalp in Europe. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Jun 3;9(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4043670/>
174. Bikle DD. The vitamin D receptor: a tumor suppressor in skin. *Adv Exp Med Biol*. 2014;810:282-302.
175. Lu J, Goldstein KM, Chen P, Huang S, Gelbert LM, Nagpal S. Transcriptional profiling of keratinocytes reveals a vitamin D-regulated epidermal differentiation network. *J Invest Dermatol*. 2005 Apr;124(4):778-85.
176. Anand S, Rollakanti KR, Horst RL, Hasan T, Maytin EV. Combination of oral vitamin D3 with photodynamic therapy enhances tumor cell death in a murine model of cutaneous squamous cell carcinoma. *Photochem Photobiol*. 2014 Oct;90(5):1126-35.
177. Yang D-F, Chen J-H, Chiang C-P, Huang Z, Lee J-W, Liu C-J, et al. Improve efficacy of topical ALA-PDT by calcipotriol through up-regulation of coproporphyrinogen oxidase. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014 Sep;11(3):331-41.
178. Bay C, Togsverd-Bo K, Lerche CM, Haedersdal M. Skin tumor development after UV irradiation and photodynamic therapy is unaffected by short-term pretreatment with 5-fluorouracil, imiquimod and calcipotriol. An experimental hairless mouse study. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Jan;154:34-9.
179. Torezan L, Grinblat B, Valente N, Szeimies RM, Haedersdal M. Potential impact of patient vitamin D status in AK response to MAL-PDT. In: *XV Congreso Anual de la Sociedad Europea de Terapia Fotodinámica*. Barcelona; 2016.
180. L Torezan, B Grinblat, C Festa-Neto, RM Szeimies. Topical vitamin D combined with cPDT. In: *XVI Congreso Anual de la Sociedad Europea de Terapia Fotodinámica*. Munich, Alemania; 2017.
181. Nissen CV, Wiegell SR, Philipsen PA, Wulf HC. Short-term chemical pretreatment cannot replace curettage in photodynamic therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2016 May;32(3):146-52.
182. Nissen CV, Heerfordt IM, Wiegell SR, Mikkelsen CS, Wulf HC. Increased protoporphyrin IX accumulation does not improve the effect of photodynamic therapy for actinic keratosis: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2016 Oct 1;
183. Trowbridge RM, Mitkov MV, Hunter WJ, Agrawal DK. Vitamin D Receptor and CD86 Expression in the Skin of Vitamin D-Deficient Swine. *Exp Mol Pathol*. 2014 Feb;96(1):42-7.
184. Hustmyer FG, DeLuca HF, Peacock M. ApaI, BsmI, EcoRV and TaqI polymorphisms at the human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, blacks and Asians. *Hum Mol Genet*. 1993 Apr;2(4):487.
185. Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001 Apr;2(2):203-16.
186. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin

- D3 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science*. 1997 Sep 19;277(5333):1827–30.
187. Zhang M, Zhao L-J, Zhou Y, Badr R, Watson P, Ye A, et al. SNP rs11185644 of RXRA gene is identified for dose-response variability to vitamin D3 supplementation: a randomized clinical trial. *Sci Rep*. 2017 Jan 12;7:40593.
 188. Thacher TD, Fischer PR, Singh RJ, Roizen J, Levine MA. CYP2R1 Mutations Impair Generation of 25-hydroxyvitamin D and Cause an Atypical Form of Vitamin D Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Jul;100(7):E1005–1013.
 189. Vural P, Canbaz M, Sekçuki D, Murat A. Lipid profile in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Int J Dermatol*. 1999 Jun;38(6):439–42.
 190. Zamanian A, Rokni GR, Ansar A, Mobasher P, Jazi GA. Should variation of serum lipid levels be considered a risk factor for the development of basal cell carcinoma? *Adv Biomed Res* [Internet]. 2014 Mar 31;3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009750/>
 191. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med*. 2009 Sep 1;47(5):469–84.
 192. Broekgaarden M, Weijer R, van Gulik TM, Hamblin MR, Heger M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34:643–90.
 193. Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2012 Feb 1;122(2):464–72.
 194. Smits T, van Laarhoven AIM, Staassen A, van de Kerkhof PCM, van Erp PEJ, Gerritsen M-JP. Induction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. *Br J Dermatol*. 2009 Apr;160(4):849–57.
 195. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*. 2002 Apr 18;21(17):2613–22.
 196. Végran F, Boidot R. Survivin-3B promotes chemoresistance and immune escape by inhibiting caspase-8 and -6 in cancer cells. *Oncoimmunology*. 2013 Nov 1;2(11):e26328.
 197. Oh E-T, Byun M-S, Lee H, Park M-T, Jue D-M, Lee C-W, et al. Aurora-a contributes to radioresistance by increasing NF-kappaB DNA binding. *Radiat Res*. 2010 Sep;174(3):265–73.
 198. Ferrario A, Rucker N, Wong S, Luna M, Gomer CJ. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res*. 2007 May 15;67(10):4989–95.
 199. Milla LN, Cogno IS, Rodríguez ME, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Gilaberte Y, et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem*. 2011 Sep;112(9):2266–78.
 200. Chaves YN, Torezan LA, Lourenço SV, Neto CF. Evaluation of the efficacy of photodynamic therapy for the treatment of actinic cheilitis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2017 Jan;33(1):14–21.

H.1. Anexo 1: Carta de aprobación del C.E.I.C.



Hospital Universitario
Puerta de Hierro Majadahonda



**D^a. CRISTINA AVENDAÑO SOLÁ, PRESIDENTA DEL COMITÉ ETICO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE
HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID**

C E R T I F I C A

Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado:

**“INFLUENCIA DEL NIVEL DE VITAMINA D Y LOS POLIMORFISMOS DEL
RECEPTOR DE LA VITAMINA D EN LA RESPUESTA DE LAS QUERATOSIS
ACTÍNICAS AL TRATAMIENTO CON TERAPIA FOTODINÁMICA, IMIQUIMOD
TÓPICO E INGENOL MEBUTATO TÓPICO.”**

del que es Investigador Principal el Dr. Ricardo Moreno Alonso de Celada,
Servicio de Dermatología del Hospital del Henares, considerando que su
planteamiento global es aceptable desde el punto de vista metodológico y ético.
Acta nº 299.

En Majadahonda, a 12 de mayo de 2014



Fdo.: Dra. Avendaño Solá
Presidenta del CEIC

ZONA NOROESTE
C/ Joaquín Rodrigo, 2
28222 Majadahonda / Madrid



H.2. Anexo 2: Documento de consentimiento informado del estudio

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Estudio observacional prospectivo sobre la influencia del estatus de vitamina D y los polimorfismos de varios genes del VDR en la respuesta de las queratosis actínicas al tratamiento con imiquimod tópico, ingenol mebutato tópico y terapia fotodinámica.

Nos dirigimos a usted para **informarle** sobre un proyecto de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido autorizado por el Sistema Nacional de Salud, de acuerdo a la legislación vigente y en concreto, la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere que su hijo/a participe o no en este estudio.

Debe saber que su participación es voluntaria, pudiendo cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que ello tenga repercusiones en su atención sanitaria.

El presente estudio está destinado a conocer si existe déficit de vitamina D en la población con queratosis actínicas de nuestro área, y también a entender si la vitamina D puede intervenir en la respuesta de las queratosis actínicas a sus tratamiento convencionales, y así ayudar al mejor manejo de esta enfermedad.

Las **queratosis actínicas** son lesiones cutáneas precancerosas en forma de manchas enrojecidas y ásperas que aparecen en la piel expuesta crónicamente al sol: cara, cuero cabelludo, manos, brazos y piernas. Se le propone participar en este estudio porque Vd. presenta lesiones de este tipo.

El proceso de estudio **consiste** en realizar ciertas determinaciones sanguíneas en relación con la vitamina D, y biopsias de piel antes y después de que Vd. siga tratamiento para sus queratosis actínicas. Para ello se le realizará una extracción sanguínea y una pequeña biopsia (3mm) de una queratosis actínica, y se repetirán estos dos procedimientos 4 semanas después de que haya terminado el tratamiento que le corresponde seguir para sus queratosis actínicas.

El **objetivo** radica en poder conocer realmente los niveles de vitamina D de la población que presenta estas lesiones precancerosas y comprender cómo puede influir la vitamina D en su tratamiento, para de esta manera mejorar su manejo.

La colaboración en el presente comprende la realización de dos encuestas así como la extracción de dos muestras de sangre y las dos pequeñas biopsias de piel. Dichas pruebas no entraña ningún riesgo para la salud, salvo los propios de estos procedimientos.

En cuanto a la **confidencialidad** de sus muestras, y siguiendo el protocolo para estos casos, éstas serán conservadas en el Laboratorio y el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital El Escorial.

Los datos recogidos en el estudio tendrán únicamente carácter científico y en ningún caso, serán utilizados con fines comerciales. Asimismo, estarán a disposición de los intervinientes en el estudio, siempre y cuando así lo deseen. En caso de obtención de

datos genéticos estos se conservarán al menos 5 años y posteriormente a esa fecha Vd. podrá pedir su cancelación. Si existieran descubrimientos inesperados que requieran de consejo genético se le informará una vez obtenidos y evaluados los resultados.

En lo atinente a los datos personales, éstos serán anonimizados y confidenciales, no pudiendo ser utilizados salvo que medie su consentimiento expreso.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) y al Comité Ético de Investigación Clínica, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO SOBRE LA INFLUENCIA DE LA VITAMINA D EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS:

Yo, (nombre y apellidos del participante)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.
- He hablado con *el Dr. Ricardo Moreno Alonso de Celada* (nombre del investigador)
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarlo del estudio:
 - 1) cuando quiera
 - 2) sin tener que dar explicaciones
 - 3) sin que esto repercuta en sus cuidados médicos
- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

- Deseo ser informado sobre los resultados del estudio: sí no
(marque lo que proceda)

- Acepto que las muestras derivadas de este estudio puedan ser utilizadas en futuras investigaciones (relacionadas con ésta), incluyendo los análisis genéticos: sí no (marque lo que proceda)

- Doy mi conformidad para que mis datos clínicos sean revisados por personal ajeno al centro, para los fines del estudio, y soy consciente de que este consentimiento es revocable.

- He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del participante o representante

legal:

Fecha:

.....

.....

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado


Firma del Investigador: *Ricardo Moreno Alonso de
Celada*

Fecha:

.....

.....

H.3. Anexo 1: Documento de consentimiento informado para terapia fotodinámica

 Hospital Universitario del Henares Avda de Marie Curie s/n 28822 COSLADA	N.H.C.: 88704	
	Nombre y apellidos:	
	Fecha de nacimiento:	Sexo:
	Dirección:	
CONSENTIMIENTO INFORMADO		CIP: DLCN440919916018
TERAPIA FOTODINAMICA		

D./Dña.: _____, con DNI/Pasaporte nº **51575997S** en calidad de paciente o, en su defecto D./Dña. _____ con DNI/Pasaporte nº _____ como Representante y/o Tutor del paciente, mayor de edad, en pleno uso de mis facultades mentales manifiesto que:

He sido informado de forma satisfactoria por el Dr/Dra. _____ adscrito a la unidad de *Dermatología* de los siguientes puntos: qué es, como se realiza, para qué sirve, los riesgos existentes, posibles molestias o complicaciones y alternativas al procedimiento.

Descripción del procedimiento diagnóstico o quirúrgico susceptible de autorización: **TERAPIA FOTODINÁMICA**

1.- El objetivo de la técnica es eliminar el cáncer o el precáncer cutáneo.

La realización del tratamiento puede ser filmada con fines científicos o didácticos.

2.- El médico me ha explicado que a lo largo del tratamiento puede ser necesaria la administración de anestesia, de cuyo riesgo me informará el servicio de anestesia.

3.- El tratamiento consiste en aplicar o inyectar sustancias sensibles a la luz, radiando posteriormente, generalmente con luz visible, para lograr una destrucción de la lesión.

Sé que tras la aplicación o inyección de la sustancia se me irradiará con luz visible, aunque también puede utilizarse fuentes de luz como el láser durante el tiempo indicado por el médico.

También me ha advertido el médico que debo protegerme de la exposición solar durante el tiempo que me indique.

4.- Comprendo que a pesar de la adecuada elección del tratamiento y de su correcta realización pueden presentarse efectos indeseables, como dolor local, hinchazón alrededor del área tratada, ampollas, necrosis, eczema de contacto e infecciones.

Sé igualmente que debo avisar posibles alergias medicamentosas, cicatrizaciones anómalas, alteraciones de la coagulación, enfermedades cardiopulmonares, prótesis, marcapasos, medicaciones actuales y cualquier otra circunstancia.



Otros riesgos o complicaciones que pueden aparecer teniendo en cuenta mis circunstancias personales (estado previo de salud, edad, profesión, creencias, etc.) son:

5.- En mi caso particular, se ha considerado que éste es el tratamiento más adecuado, aunque pueden existir otras alternativas que estarían indicadas en otro caso y que he tenido la oportunidad de comentar con el médico. También he sido informado de las posibles consecuencias de no realizar el tratamiento que se me propone.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.




También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del tratamiento. Doy mi consentimiento para que en la intervención participen profesionales sanitarios en formación.

Madrid, a 19/06/2017 Firma del Paciente / Representante y/o Tutor	Madrid, a 19/06/2017. Identificación y firma del médico que informa
	
 CONSEJERÍA DE SANIDAD Comunidad de Madrid	Nota: Se deben firmar todas las páginas.
C.58.06	Página 1 de 2

 Hospital Universitario del Henares Avda de Marie Curie s/n 28822 COSLADA	N.H.C.: 88704	
	Nombre y apellidos:	
	Fecha de nacimiento:	Sexo:
	Dirección:	
CONSENTIMIENTO INFORMADO		CIP: DLCN440919916018
TERAPIA FOTODINAMICA		

REVOCACIÓN		
Dn/Dña.....de.....años de edad. (Nombre y dos apellidos del paciente)		
Con domicilio en.....y D.N.I nº.....		
Dn/Dña.....de.....años de edad. (Nombre y dos apellidos)		
Con domicilio en.....y D.N.I nº.....		
En calidad de.....de..... (Representante legal, familiar o allegado) (Nombre y dos apellidos del paciente)		
REVOCO el consentimiento prestado en fecha....., y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.		
Fdo: El/la Médico	Fdo: El Paciente	Fdo: El representante legal, familiar o allegado

Madrid, a 19/06/2017 Firma del Paciente / Representante y/o Tutor		Madrid, a 19/06/2017. Identificación y firma del médico que informa	
			
 CONSEJERÍA DE SANIDAD Comunidad de Madrid	Nota: Se deben firmar todas las páginas.	C.58.06	Página 2 de 2